

Identifizierung und Charakterisierung evolutionär konservierter Komponenten des Protein-Translokationsapparates im Endoplasmatischen Retikulum

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

An der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologe Hellmuth-Alexander Meyer

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Bernhard Ronacher

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Gutachter:

1. Prof. Dr. E. Hartmann

2. Prof. Dr. W. Lockau

3. Prof. Dr. R. Erdmann

Datum der Promotion: 18.05.2001

Abstract

Im Gegensatz zur den monomeren Leaderpeptidasen der bakteriellen Plasmamembran bestehen die eukaryotischen Signalpeptidasen der ER-Membran aus einem heteromeren Protein-Komplex. In der Hefe *S. cerevisiae* setzt sich die Signalpeptidase aus den vier Membranproteinen Sec11p, Spc1p, Spc2p und Spc3p zusammen. Neben der zur prokaryontischen Leaderpeptidase homologen Untereinheit Sec11p wird auch Spc3p benötigt um die Spaltungsfunktion in der Zelle auszuüben. Die Deletion von SPC3 führt zu einer lethalen Akkumulation von sekretorischen Vorstufenproteinen in vivo, sowie zum Verlust der Spaltungsaktivität in vitro. Spc1p und Spc2p sind nicht essentiell für die Hefe. Für Spc2p konnte jedoch gezeigt werden, daß die Signalpeptidase über die Spc2p Untereinheit mit den β -Untereinheiten des Sec61-Komplexes und des Ssh1-Komplexes interagiert. Vermutlich wird es so dem Komplex ermöglicht, während des Translokationsprozesses engen Kontakt zu der im Translokationskanal befindlichen Signalsequenz aufzunehmen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden neue Komponenten aus der ER Membran von Säugern aufgereinigt. Dabei wurde ein ribosomenfreier Sec61-Komplex entdeckt, der mit zwei weiteren Membranproteinen assoziiert ist. Die beiden neuen Membranproteine weisen Homologien zu essentiellen Untereinheiten des postranslational aktiven Sec-Komplexes der Hefe *S. cerevisiae* auf. Die Rolle des neu entdeckten Säugerkomplexes während der Protein-translokation ist noch unbekannt, in der Arbeit werden mögliche Funktionen des Komplexes diskutiert.

Signalpeptidase
ER-Transport
Sec61
Sec63

Abstract

In contrast to the monomer leaderpeptidase of the prokaryotic plasmamembrane, the eukaryotic signalpeptidase of the ER-membrane is a heteromer protein complex. In yeast the signalpeptidase consist of the four subunits Sec11p, Spc1p, Spc2p and Spc3p. Additional to Sec11p also Spc3p is essential for cell growth and cell life. The depletion of Spc3p cause lethal accumulation of precursor proteins in vivo and lost of cleavage activity in vitro. Spc1p and Spc2p are not essential for the cell. We show here, that the Spc2p subunit interacts with the β -subunits of the Sec61- and the Ssh1-complex. These data implicate that Spc2p facilitates the interactions between different components of the translocation site.

In yeast, efficient protein transport across the endoplasmic reticulum (ER) membrane may occur co-translationally or post-translationally. The latter process is mediated by a membrane protein complex that consists of the Sec61p complex and the Sec62p-Sec63p subcomplex. In contrast, in mammalian cells protein translocation is almost exclusively co-translational. This transport depends on the Sec61 complex, which is homologous to the yeast Sec61p complex and has been identified in mammals as a ribosome-bound pore-forming membrane protein complex. We report here the existence of ribosome-free mammalian Sec61 complexes that associate with two ubiquitous proteins of the ER membrane. According to primary sequence analysis both proteins display homology to the yeast proteins Sec62p and Sec63p and are therefore named Sec62 and Sec63, respectively. The probable function of the mammalian Sec61-Sec62-Sec63 complex is discussed with respect to its abundance in ER membranes, which, in contrast to yeast ER membranes, apparently lack efficient post-translational translocation activity.

signalpeptidase
Sec61
Translocation
Sec63

1	ZUSAMMENFASSUNG.....	4
2	EINLEITUNG.....	5
2.1	TRANSPORT VON PROTEINEN IN DAS LUMEN DES ER.....	5
2.1.1	Transportsignale für den Transport ins ER.....	5
2.1.2	Der cotranslationale Proteintransport in das ER.....	6
2.1.3	Der posttranslationale Proteintransport in das ER.....	9
2.1.4	Posttranslationale Modifikationen der Polypeptidkette.....	13
2.2	ZIELSETZUNG	15
3	MATERIAL UND METHODEN	16
3.1	MATERIAL	16
3.1.1	Chemikalien, Enzyme und Medien.....	16
3.1.2	Puffer und Lösungen.....	16
3.1.3	Detergenzien.....	17
3.1.4	Lipide.....	17
3.1.5	Versuchsorganismen.....	17
3.1.6	Antikörper.....	18
3.1.7	Plasmide	19
3.2	METHODEN.....	20
3.2.1	Molekularbiologische Methoden	20
3.2.2	Hefegenetische Methoden.....	20
3.2.3	Proteinanalytische Methoden	22
3.2.4	Biochemische Methoden	22
3.2.5	Proteinbiochemische Methoden.....	23
4	ERGEBNISSE.....	26
4.1	DER ER-SIGNALPEPTIDASE KOMPLEX DER HEFE	26
4.1.1	Die Signalpeptidase der Hefe ist ein heteromerer Protein-Komplex.....	26
4.1.2	Analyse der Funktion von Spc3p	32
4.1.3	Analyse der Funktion von Spc2p	37
4.2	IDENTIFIZIERUNG EINER SEC-KOMPLEX ÄHNLICHEN STRUKTUR IM SÄUGER	43
4.2.1	Identifizierung und Klonierung von Sec62p und Sec63p homologen Proteinen im Säuger.....	43
4.2.2	Charakterisierung des Sec63/Sec61 Subkomplexes.....	47
4.2.3	Sec62 und Sec63 sind nicht mit membrangebundenen Ribosomen assoziiert.....	48
4.2.4	Sec62 und Sec63 sind assoziiert mit dem Sec61-Komplex.....	50
4.2.5	Zelluläre Expression und Lokalisation von Sec62 und Sec63	53
5	DISKUSSION.....	55
5.1	DIE SIGNALPEPTIDASE.....	55
5.1.1	Eukaryonten besitzen einen konservierten ER-Signalpeptidase-Komplex.....	55
5.1.2	Sec11p und Spc3p werden für die katalytische Aktivität der ER-Signalpeptidase benötigt.....	57
5.1.3	Spc1p und Spc2p unterstützen die Spaltungsaktivität des SP-Komplexes	59
5.1.4	Der SP-Komplex interagiert mit der Translokationspore.....	59
5.2	IDENTIFIZIERUNG EINES SEC-KOMPLEX ÄHNLICHEN TRANSLOKATIONSKOMPLEXES IM SÄUGER.....	61
5.2.1	Säuger-Sec61 α ist assoziiert mit Sec62 und Sec63.....	61
5.2.2	Mögliche Funktion des pentameren Säuger- Sec61/62/63 Komplexes	62
5.3	EVOLUTIONÄR KONSERVIERTE KOMPONENTEN DES ER-TRANSLOKATIONSAPPARATES	63
6	ANHANG	66

1 Zusammenfassung

In den letzten Jahren konnten die Hauptkomponenten des im rauen Endoplasmatischen Retikulum (ER) befindlichen Protein-Translokationsapparates (Translokons) identifiziert werden. Bei vielen der gefundenen Komponenten des Translokons ist inzwischen bekannt, an welchen generellen Teilschritten des Proteintransportes sie beteiligt sind. Der posttranslationale Transport löslicher Proteine wurde dabei vor allem in der Hefe untersucht, wogegen der cotranslationale Transport von löslichen und Membranproteinen hauptsächlich in Säugern analysiert wurde. Viele der Komponenten des Translokons aus Hefe und Säuger sind konserviert. Jedoch gibt es einzelne Subkomplexe oder Teile von Subkomplexen, die bisher nur exklusiv in einer der beiden Gruppen von Eukaryonten identifiziert wurden. In der vorliegenden Arbeit konnte für zwei solcher Subkomplexe gezeigt werden, daß jeweils homologe Strukturen in beiden Modellorganismen existieren. Die vorgestellten Ergebnisse unterstützen somit die Aussage, daß das Translokons als ganzes in der ER-Membran hochgradig konserviert ist.

Der erste Teil der Arbeit befaßt sich mit der Signalpeptidase aus der ER-Membran der Hefe *S. cerevisiae*. Die Signalpeptidase setzt sich in der Hefe aus den vier Untereinheiten Sec11p, Spc1p, Spc2p und Spc3p zusammen, wobei Spc2p und Spc3p erstmals in dieser Arbeit identifiziert wurden. Mit der Entdeckung der beiden neuen Proteine wurde es möglich jeder Untereinheit des Hefe-Komplexes ein entsprechendes homologes Protein aus dem Signalpeptidase-Komplex des Säugers zuzuordnen. Das für das Überleben der Zelle essentielle Sec11p besitzt dabei signifikante Homologien zu SPC18 und zu SPC21. Spc1p ist homolog zu SPC12, Spc2p zu SPC25 und Spc3p zu SPC22/23.

Die Analyse der Funktion von Spc3p ergab, daß das Protein ebenso wie Sec11p essentiell für das Überleben der Zelle ist. Die Deletion von *SPC3* führt zu einer Akkumulation von sekretorischen Vorstufenproteinen *in vivo*, sowie zum Verlust der Spaltungsaktivität *in vitro*. Damit konnte gezeigt werden, daß im Gegensatz zu den monomeren Leaderpeptidasen der bakteriellen Plasmamembran (die deutliche Homologien zu Sec11p aufweisen) die heteromeren Signalpeptidase-Komplexe der eukaryontischen ER-Membran eine zweite Untereinheit neben Sec11p benötigen, um ihre Spaltungsfunktion auszuführen.

Spc2p spielt eine wichtige, jedoch nicht essentielle Rolle im Signalpeptidase-Komplex. Der Verlust von Spc2p reduziert die Spaltungsaktivität der Signalpeptidase *in vitro*. Auch wird Spc1p nicht mehr stabil in die Signalpeptidase integriert und die Mengen an Sec11p und Spc3p in der ER-Membran reduzieren sich. Außerdem konnte gezeigt werden, daß der Signalpeptidase-Komplex über die Spc2p Untereinheit mit den β -Untereinheiten des Sec61-Komplexes und des Ssh1-Komplexes interagiert. Vermutlich wird es so der Signalpeptidase ermöglicht, während des Translokationsprozesses engen Kontakt zu der im Translokationskanal befindlichen Signalsequenz aufzunehmen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden neue Komponenten aus der ER Membran von Säugern aufgereinigt. In Säugerzellen findet der Großteil des Proteintransportes über die ER-Membran cotranslational statt. Für einige Substrate konnte jedoch auch im Säuger gezeigt werden, daß sie in einem SRP-unabhängigen, vermutlich posttranslationalen Modus ins Lumen des ER transportiert werden. In der Hefe *S. cerevisiae* erfolgt der posttranslationale Transport mittels des Sec-Komplexes, der sich aus dem Sec61-Komplex und dem Sec62/Sec63 Subkomplex zusammensetzt. Im Säuger kennt man hingegen bisher keine Komponenten, die den posttranslationalen Transportweg ermöglichen.

Die vorliegende Arbeit zeigt, daß in der ER-Membran von Säugerzellen ein ribosomenfreier Sec61-Komplex existiert, der mit zwei weiteren Membranproteinen assoziiert ist. Die beiden neuen Membranproteine weisen Homologien zu Sec62p bzw. Sec63p aus der Hefe auf und wurden dementsprechend Sec62 und Sec63 benannt. Beide Proteine werden ubiquitär in der ER-Membran expremiert, wobei interessanterweise die Proteine nicht nur im rauen, sondern auch im glatten ER nachweisbar sind. Schätzungsweise liegen bis zu 15 % aller Sec61-Komplexe in der ER-Membran in Form des Sec61/62/63-Komplexes vor. Da die Rolle des Sec61/62/63-Komplexes während der Proteintranslokation noch unbekannt ist, werden mögliche Funktionen des Komplexes in der Arbeit diskutiert.

2 Einleitung

Die eukaryontische Zelle besitzt verschiedenste Kompartimente, in denen Stoffwechselwege effektiv und ohne gegenseitige Beeinflussung ablaufen können. Jedes dieser Kompartimente wie z. B. Zellkern, Endoplasmatisches Retikulum (ER), Golgi-Apparat, Mitochondrien oder Peroxisomen, ist von mindestens einer Membran umschlossen, die sich aus Lipiden und Proteinen zusammensetzt. Da Membranen Diffusionsbarrieren darstellen, müssen spezifische Transportmechanismen den Austausch von Metaboliten mit der Umgebung gewährleisten. Der Transport von Proteinen durch die Membran benötigt dabei komplexere Translokationssysteme als der Austausch von Ionen oder Stoffwechselprodukten.

Man kennt heute eine Reihe von Translokationssystemen in Pro- sowie Eukaryonten, die den zielgerichteten Transport von Proteinen durch Membranen ermöglichen. Viele dieser Translokationssysteme sowie auch die jeweiligen Transportsubstrate weisen gemeinsame Charakteristika auf. Die zu transportierenden Proteine enthalten in ihren Aminosäuresequenzen ein Sortierungssignal, wodurch sie an die Oberflächen der jeweiligen Bestimmungsorganellen zielgeleitet werden. An der Zielmembran angelangt, sorgt ein „Targeting-System“ dafür, daß die Proteine zum eigentlichen Translokationskanal weitergeleitet werden. Der Translokationskanal besteht aus einem porenbildenden Membranproteinkomplex, der sich zum Zielkompartiment hin öffnen kann. Der Transport durch die Membran ist energieabhängig, die Energie wird dabei in Form von ATP oder GTP bereitgestellt. Nach dem Membrandurchtritt werden die Proteine im Zielkompartiment gefaltet und gegebenenfalls noch weiter modifiziert. Translokationssysteme, die nach diesen Grundzügen funktionieren, wurden unter anderem in Mitochondrien, Plastiden sowie dem Endoplasmatischen Retikulum gefunden.

2.1 Transport von Proteinen in das Lumen des ER

In Eukaryonten werden Proteine des Sekretorischen Weges vom Cytoplasma über die ER-Membran zuerst ins Lumen des ER transportiert (Palade, 1975). Von dort aus erfolgt der Weitertransport in andere Kompartimente wie Golgi-Apparat, Lysosomen, Endosomen oder zur Plasmamembran über Vesikulations- und Fusionsvorgänge. Gleiches gilt auch für Membranproteine, deren endgültiger Bestimmungsort eines der oben genannten Kompartimente ist. Die Membranproteine werden zuerst in die Membran des Endoplasmatischen Retikulums inseriert und über Transportvesikel zum Zielkompartiment transportiert.

2.1.1 Transportsignale für den Transport ins ER

Proteine, die für den Transport ins ER bestimmt sind, besitzen in ihrer Aminosäuresequenz ein Signal, das sie spezifisch zur ER-Membran zielleitet (Signalhypothese: Blobel und Dobberstein, 1975). Bei sekretorischen Proteinen besteht das Signal aus einem 15 bis 40 Aminosäuren langen N-terminal lokalisierten Signalpeptid. Obwohl die Primärstruktur der Signalsequenz nicht konserviert ist, können drei verschiedene Bereiche unterschieden werden: ein zentraler hydrophober Kern wird N-terminal von positiv geladenen Aminosäuren und C-terminal von polaren Aminosäuren flankiert (von Heijne, 1985; Haeuptle *et al.* 1989). In den meisten Fällen wird die Signalsequenz nach dem Membrandurchtritt proteolytisch vom eigentlichen Protein abgespalten. Die Schnittstelle wird dabei durch kleine Aminosäurereste in den Positionen -3 und -1 der C-terminalen polaren Region der Signalsequenz definiert (von Heijne, 1990).

In der Hefe *S. cerevisiae* wurde gezeigt, daß die Signalsequenz nicht nur den Transportprozeß initiiert, sondern auch festlegt, wie das entsprechende Protein ins ER transportiert wird (Feldheim und Schekman, 1994; Ng *et al.*, 1996). Man unterscheidet zwischen einem cotranslationalen Mechanismus, bei dem Proteine während ihrer Synthese an membrangebundenen Ribosomen durch die Membran gelangen, und einem posttranslationalen Mechanismus, bei dem zuerst vollständig im Cytoplasma synthetisierte Proteine durch die Membran transportiert werden. Proteine mit hydrophoberen Signalsequenzen werden bevorzugt cotranslational und Proteine mit hydrophileren Signalsequenzen überwiegend posttranslational transportiert (Ng *et al.*, 1996).

Bei Membranproteinen, die keine Signalsequenz besitzen, übernimmt gewöhnlich die erste Transmembrandomäne die Funktion der Signalsequenz. Das auch als Signalankersequenz bezeichnete Segment zeichnet sich durch einen längeren hydrophoben Kernbereich, sowie eine fehlende Signalpeptidaseschnittstelle gegenüber der normalen Signalsequenz aus (Wickner und Lodish, 1985; Lipp *et al.*, 1989; Andersson und von Heijne, 1994; Spiess, 1995).

Der Großteil der Proteine, die zum ER transportiert werden, besitzt N-terminal orientierte Signal- oder Signalankersequenzen. Jedoch gibt es auch integrale Membranproteine, die ohne N-terminale Signalsequenz in die ER Membran inseriert werden. Bei diesen Proteinen erfolgt die Erkennung über ein C-terminal gelegenes hydrophobes Segment. Wie diese Proteine in die ER-Membran inserieren, ist bisher jedoch noch nicht geklärt (Kutay *et al.* 1993, 1995).

2.1.2 Der cotranslationale Proteintransport in das ER

Beim cotranslationalen Proteintransport werden die Proteine noch während ihrer Synthese am Ribosom durch die ER-Membran transportiert (Abb. 1). Der Transportprozeß beginnt mit der spezifischen Erkennung der N-terminalen Signalsequenz. Sobald die Signalsequenz an der Oberfläche des Ribosoms erscheint, wird sie vom Signalsequenzerkennungspartikel (SRP) gebunden, das im Säuger aus sechs Proteinen und einer 7s RNA besteht (Walter und Blobel, 1980; 1981; 1982; von Heijne, 1995). Das gebundene SRP interagiert dabei nicht nur mit der Signalsequenz, sondern auch mit dem Ribosom, wodurch die Synthesegeschwindigkeit der naszierenden Polypeptidkette drastisch herabgesetzt wird. Das SRP ist somit in der Lage, das Ribosom zur ER-Membran zielzuleiten, ohne daß vorher das zu transportierende Protein fertiggestellt wird (Walter *et al.*, 1981). An der ER-Membran angelangt, interagiert der Komplex aus Ribosom, naszierender Peptidkette und SRP auf zweifache Weise mit der Membran. Zum einen wird das SRP von seinem membranständigen Rezeptor (SRP-Rezeptor) gebunden (Meyer *et al.*, 1982; Gilmore *et al.*, 1982), zum anderen interagiert das Ribosom direkt mit dem tunnelbildenden Sec61-Komplex (Görlich *et al.*, 1992a; Kalies *et al.*, 1994; Jungnickel und Rapoport, 1995; Prinz *et al.*, 2000). Nachdem SRP und SRP-Rezeptor aneinander gebunden haben, löst sich das SRP unter GTP-Hydrolyse vom Ribosom und übergibt die naszierende Polypeptidkette an den eigentlichen Translokationsapparat (Connolly und Gilmore, 1989; Rapiejko und Gilmore, 1997).

Im Säugersystem konnte in Rekonstitutionsexperimenten gezeigt werden, daß neben dem SRP-Rezeptor nur noch zwei weitere Komponenten in der Membran benötigt werden, um Proteine *in vitro* cotranslational zu transportieren. Es handelt sich dabei um das TRAM-Protein (translocating chain-associated membrane protein) und um den heterotrimeren Sec61-Komplex (Görlich und Rapoport, 1993). Quervernetzungsexperimente sowie elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, daß der Sec61-Komplex den Kanal bildet, durch den die Proteine hindurchtransportiert werden. Die Kanalpore wird dabei von 3 bis 4 heterotrimeren Sec61-Komplexen gebildet, die im elektronenmikroskopischen Bild als ringförmige Struktur erscheinen (Abb. 2 B) (High *et al.*, 1991, 1993; Kellaris *et al.*, 1991; Mothes *et al.*, 1994, 1998; Nicchitta *et al.*, 1995; Hanein *et al.*, 1996).

Die Insertion der naszierenden Kette in den Translokationskanal erfolgt in zwei Schritten. Zu Beginn des Translokationsprozesses ist die Bindung zwischen Sec61-Komplex und Ribosom relativ schwach. Die Ribosomen können durch eine Hochsalzbehandlung von der Membran abgewaschen werden. Erst wenn die naszierende Kette eine Länge von ca. 70 Aminosäuren erreicht hat und eine funktionelle Signalsequenz vorhanden ist, wird die Bindung zwischen Ribosom und Sec61-Komplex hochsalzresistent. Gleichzeitig öffnet sich der Translokationskanal zur luminalen Seite des ER (Crowley *et al.*, 1994; Jungnickel und Rapoport, 1995). Durch elektronenmikroskopische Aufnahmen konnte gezeigt werden, daß das Ribosom so auf der Membranpore sitzt, daß der Sec61-Kanal eine Verlängerung des Ribosomenkanals darstellt (Beckmann *et al.*, 1997). Die GTP-abhängige Synthese der naszierenden Kette am Ribosom reicht als alleinige Kraft aus, um die naszierende Polypeptidkette ins Lumen des ER zu transportieren.

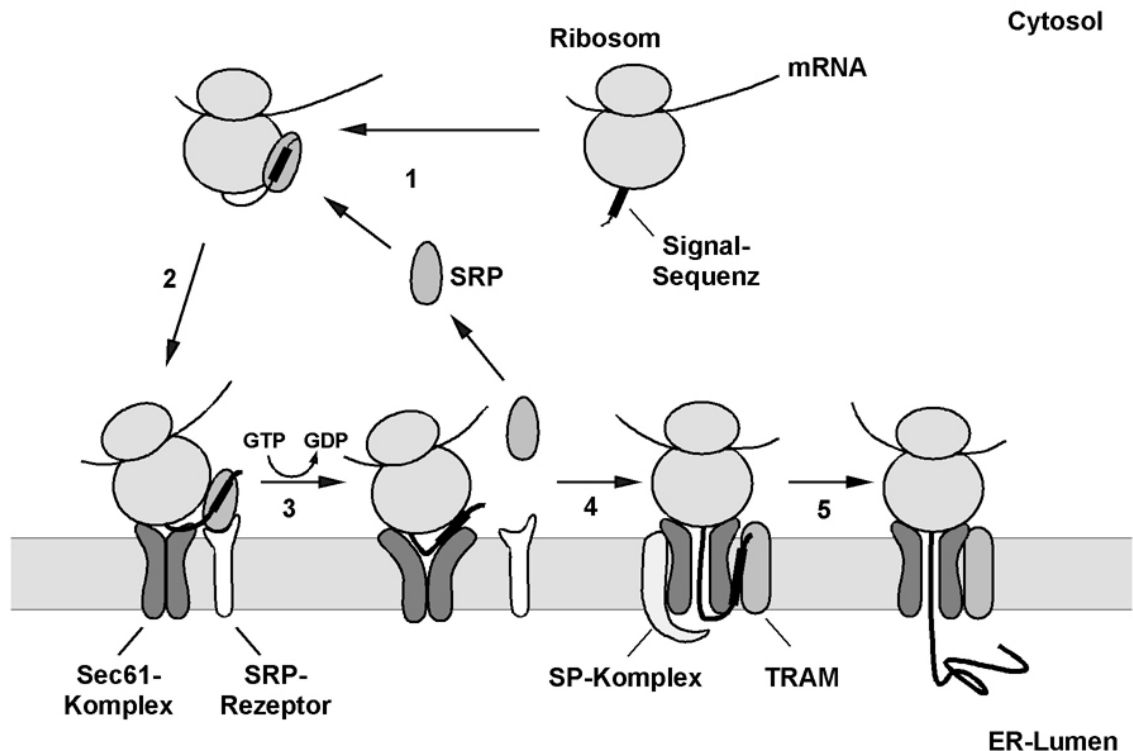


Abb. 1: **Modell des cotranslationalen Proteintransportes durch die ER-Membran in Säugerzellen.** (1) Die Signalsequenz der wachsenden Polypeptidkette wird vom SRP erkannt und gebunden. Gleichzeitig interagiert das SRP auch mit dem Ribosom, wodurch es zu einem Elongationsarrest kommt. (2) Der Komplex aus Ribosom, naszierender Polypeptidkette und SRP bindet an die ER-Membran, wobei das SRP mit seinem membranständigen Rezeptor und das Ribosom mit dem Sec61-Komplex interagiert. (3) Unter GTP-Hydrolyse wird die Signalsequenz vom SRP auf den Sec61-Komplex übertragen. Es erfolgt ein zweiter Signalsequenz-erkennungsschritt durch den Sec61-Komplex. (4) Der Translokationskanal öffnet sich zum ER-Lumen. Der N-Terminus der naszierenden Kette liegt in einer Haarnadelkonformation vor, wobei der eine Teil der Schleife von der Signalsequenz und der andere Teil von den C-terminal nachfolgenden Abschnitten der Polypeptidkette gebildet wird. Die Signalsequenz interagiert dabei mit Sec61 α , TRAMP und Membranlipiden. Durch die weitere Elongation der Polypeptidkette wird der C-terminale Bereich der Schleife durch die Membran geschoben. Die Signalsequenz wird dabei vom restlichen Protein durch den Signalpeptidase-Komplex (SP-Komplex) abgespalten. (5) Anschließend wird die restliche naszierende Polypeptidkette direkt durch den von Ribosom und Sec61-Komplex gebildeten Kanal ins Lumen des ER transportiert.

2.1.2.1 Der Sec61-Komplex

Zentrale Komponente des eukaryontischen ER-Translokationsapparates ist der heterotrimere Sec61-Komplex, der im Säuger aus den Untereinheiten Sec61 α , Sec61 β und Sec61 γ gebildet wird (Abb. 2A). Bei Sec61 α handelt es sich um ein multimembranspannendes Protein mit 10 Transmembransegmenten, wobei der C- und N-Terminus jeweils im Cytoplasma lokalisiert sind. Die große Anzahl an Transmembranbereichen prädestiniert die α -Untereinheit dazu, den eigentlichen Translokationskanal zu bilden. Sec61 β und Sec61 γ besitzen jeweils nur eine Transmembrandomäne nahe dem luminal liegenden C-Terminus (Görlich *et al.* 1992a; Görlich und Rapoport, 1993). Beide Proteine gehören außerdem zu der Gruppe von Membranproteinen, die nicht über eine N-terminale Signal(anker)sequenz, sondern über ein C-terminal gelegenes hydrophobes Segment in die Membran inserieren werden (Hartmann *et al.*, 1994).

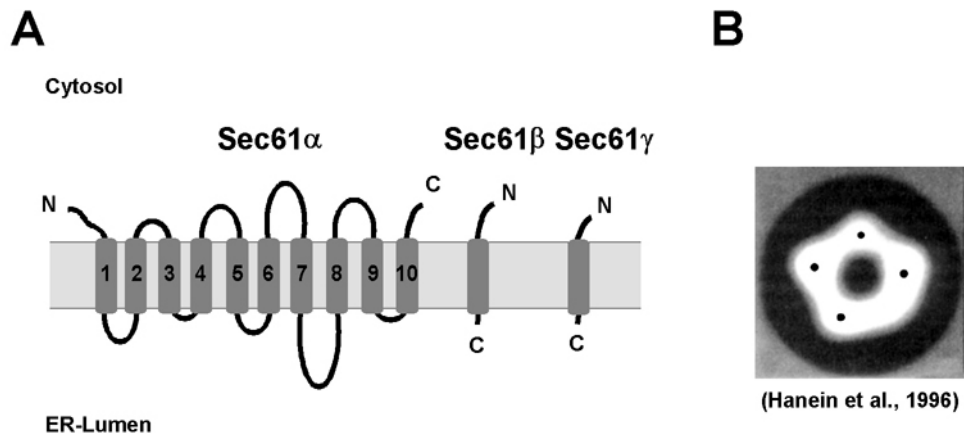


Abb. 2: Der Sec61-Komplex aus Säugerzellen.

A) Schematische Darstellung des Sec61-Komplexes. Der Komplex besteht aus den drei Membranproteinen Sec61 α , β und γ . Die Transmembransegmente der Proteine sind als graue Zylinder dargestellt. **B) Errechnete elektronenmikroskopische Durchschnittsdarstellung der Sec61-Pore** aus 125 Einzelobjekten. Die Masseschwerpunkte sind durch schwarze Punkte gekennzeichnet. Die Ringstruktur in der Membran setzt sich aus drei bis vier Sec61-Komplexen zusammen (Hanein *et al.*, 1996).

In einer Vielzahl von eukaryontischen Organismen wurden homologe Proteine zu den Untereinheiten des Säuger Sec61-Komplexes identifiziert. In der Hefe *S. cerevisiae* wird der Komplex aus den Untereinheiten Sec61p, Sbh1p (**Sec** sixty-one **beta** homolog) und Sss1p (**Sec**-sixty-one **s**uppressor) gebildet (siehe Faltblatt im Anhang: Abb. 35). Durch Deletionsmutanten konnte gezeigt werden, daß die Proteine Sec61p und Sss1p essentiell für das Überleben der Hefezelle sind (Stirling *et al.*, 1992; Esnault *et al.*, 1993). Sss1p ist das Hefe-Homologe zur γ -Untereinheit des Säugers (43% identische Aminosäuren). Die beiden Proteine sind so stark konserviert, daß das Sec61 γ in Hefezellen die Funktion des Sss1p ersetzen kann (Hartmann *et al.*, 1994).

Mittels chemischer Quervernetzungsexperimente konnte gezeigt werden, daß Sss1p mit den Transmembranbereichen TM6, TM7 und TM8 von Sec61p interagiert (Wilkinson *et al.*, 1996). Von Sec61p ist desweiteren bekannt, daß die Transmembrandomänen TM2 und TM7 des Proteins mit einer im Kanal gebundenen Signalsequenz quervernetzt werden können (Plath *et al.*, 1998). Die Bindungsstellen von Sss1p bzw. einer gebundenen Signalsequenz am Sec61p überlappen somit teilweise. Nach einem von Plath *et al.* (1998) vorgestellten Modell fungiert Sss1p als „Ersatz-Signalsequenz“, die in Abwesenheit eines Transportsubstrates den Kanal verschließt. Während der Signalsequenzerkennung wird Sss1p durch die Signalsequenz des Transportsubstrates verdrängt, wobei sich der Kanal für den Polypeptidtransport öffnet. Die β -Untereinheit des Sec61-Komplexes, Sbh1p, ist für das Überleben der Hefe nicht essentiell. Auch sind die Homologien zwischen den β -Untereinheiten der Sec61-Komplexe aus Säuger und Hefe weniger deutlich ausgeprägt (22 % identische Aminosäuren) als bei den beiden anderen Untereinheiten (Finke *et al.*, 1996).

In der Hefe *S. cerevisiae* existiert noch ein zweiter Komplex, der Homologien zum Sec61-Komplex besitzt. Es handelt sich um den Ssh1-Komplex, bestehend aus Ssh1p (**Sec** sixty-one homolog), Sbh2p (**Sec** sixty-one **beta** homolog) und Sss1p (siehe Faltblatt im Anhang: Abb. 35). Die Untereinheit Ssh1p ist homolog zum Sec61p (32 % identische Aminosäuren) und Sbh2p zu Sbh1p (52% identische Aminosäuren). Sss1p findet man sowohl im Ssh1- als auch im Sec61-Komplex der Hefe. Da die alleinige Deletion des *SEC61*-Gens für die Zelle lethal ist, scheint der Ssh1-Komplex die Funktion des Sec61-Komplex in der Hefe nicht ersetzen zu können. Hingegen sind *SSH1* und *SBH2* nicht für das Überleben der Zelle essentiell (Finke *et al.*, 1996).

Im Gegensatz zum Sec61-Komplex kann der Ssh1-Komplex nicht mit dem Sec62/63 Subkomplex (siehe 2.1.3) assoziieren. Der Ssh1-Komplex ist daher wahrscheinlich nur am cotranslationalen Transport in der Zelle beteiligt, während der Sec61-Komplex sowohl für co- als auch für posttranslationalen Transport zur Verfügung steht. Es wird vermutet, daß der Ssh1-Komplex in der ER-Membran eine regulatorische Funktion übernimmt, indem er das Verhältnis zwischen co- und posttranslationalem Transport in der Zelle beeinflusst (Panzner *et al.*, 1995; Finke *et al.*, 1996).

Homologe Proteine zum Säuger Sec61 α sowie Sec61 γ wurden nicht nur in Eukaryonten gefunden, sondern auch in Archaeobakterien, Eubakterien und Chloroplasten. Die bakteriellen Homologen von Sec61 α und Sec61 γ , SecY und SecE, bilden zusammen mit SecG den bakteriellen SecYEG Komplex, der essentiell für den Proteintransport durch die Plasmamembran der Bakterienzelle ist. Der Sec61-Komplex gehört somit zu einer Gruppe von Translokationskomplexen, die sich wahrscheinlich sehr früh in der Evolution entwickelt haben und in allen Reichen vertreten sind (Pohlschröder *et al.*, 1997).

2.1.2.2 Das TRAM Protein

Im Säugersystem wird für den erfolgreichen Transport bestimmter Testsubstrate *in vitro* neben dem Sec61-Komplex und dem SRP-Rezeptor auch noch das TRAMP-Protein benötigt (Görlich *et al.*, 1992b). Ob ein Protein TRAMP-abhängig transportiert wird, hängt von der Beschaffenheit der jeweiligen Signalsequenz ab (Voigt *et al.*, 1996). Neben der Interaktion von TRAMP mit der Signalsequenz spielt das Protein auch eine Rolle bei der cotranslationalen Integration von Membranankern in die Lipidschicht (High *et al.*, 1993; Mothes *et al.*, 1994; Do *et al.*, 1996; Knight und High, 1998; Heinrich *et al.*, 2000), sowie beim so genannten „pausing“-Prozeß. Der „pausing“-Prozeß beschreibt das Phänomen, daß in einigen Fällen der cotranslationale Transport diskontinuierlich verläuft. Spezifische Signale im Protein führen zum zeitweiligen Stop des Transports der Polypeptidkette durch die Membran, wobei jedoch gleichzeitig die Synthese des Proteins am Ribosom normal weiterläuft. „Pausing“ findet nur abhängig vom TRAMP statt (Hedge *et al.*, 1998). Die während des „pausing“-Prozeß im Cytoplasma akkumulierten Domänen des zu transportierenden Proteins müssen nach Wiederaufnahme der Translokation wahrscheinlich posttranslational ins Lumen des ER transportiert werden. In welcher Form dies geschieht und welche Faktoren in der Säugerzelle dafür benötigt werden, ist bisher noch unbekannt.

2.1.3 Der posttranslationale Proteintransport in das ER

Im Gegensatz zum cotranslationalen Transport werden beim posttranslationalen Transport die Proteine vollständig im Cytoplasma synthetisiert und erst anschließend durch die ER-Membran transportiert. Der Großteil der heute vorhandenen Erkenntnisse über diese Form des Transportes stammt aus Untersuchungen, die in der Hefe *S. cerevisiae* durchgeführt wurden.

Wie bereits erwähnt, bestimmt die Signalsequenz, ob ein sekretorisches Protein co- oder posttranslational in das ER transportiert wird. Bei hydrophileren Signalsequenzen scheint die Affinität des SRP zur Signalsequenz geringer ausgeprägt zu sein, wodurch es zu keiner festen Bindung und somit zu keinem Translationsarrest kommt. Das Protein wird vollständig im Cytoplasma synthetisiert und vom Ribosom abgelöst. Um das Transportsubstrat in einem translokationskompetenten Zustand zu halten, binden wahrscheinlich cytosolische Chaperone der Hsp70-Familie (Deshaies *et al.*, 1988; Chirico, 1992). Über den nachfolgenden Prozeß der Zielleitung des Proteins zur ER-Membran ist wenig bekannt. Die gebundenen cytosolischen Faktoren scheinen jedoch für den eigentlichen Transport durch die ER-Membran keine essentielle Rolle zu spielen, da durch Harnstoff denaturierter PräPro- α -Faktor *in vitro* genau so effizient posttranslational transportiert wird wie das native Protein (Chirico *et al.*, 1988).

Rekonstitutionsexperimente mit aufgereinigten Komponenten aus Hefemikrosomen zeigten, daß neben dem luminalen Chaperon Kar2p und ATP ein spezieller Membrankomplex benötigt wird, um *in vitro* posttranslational PräPro- α -Faktor zu transportieren. Bei diesem Komplex handelt es sich um den hetero-heptameren Sec-Komplex, der sich aus dem trimeren Sec61-Komplex und dem tetrameren Sec62/Sec63-Komplex zusammensetzt (Deshaies *et al.* 1991; Panzner *et al.*, 1995; Wittke *et al.*, 1999). Der Sec-Komplex bildet dabei, ähnlich wie das Ribosom mit dem Sec61-Komplex, ringförmige Strukturen in der Membran aus (Hanein *et al.*, 1996).

Der eigentliche posttranslationale Transport der Proteine durch die ER-Membran erfolgt in zwei Schritten (Abb. 3). Zuerst bindet das zu transportierende Protein, Kar2p- und ATP-unabhängig an den Sec-Komplex, wobei die cytosolisch liegenden Komponenten des Sec62/Sec63-Subkomplexes wahrscheinlich eine Art „Signalsequenz-Antenne“ in der Membran bilden (Lyman und Schekman, 1997; Dünwald *et al.*, 1999). Durch Quervernetzungsstudien konnte gezeigt werden, daß die Signalsequenz des Proteins während dieser Phase von der großen Untereinheit des Sec61-Komplexes erkannt und gebunden wird (Plath *et al.*, 1998). Im zweiten Schritt des Transportprozesses wird die gebundene Polypeptidkette wie beim cotranslationalen Transport durch den vom Sec61-Komplex gebildeten Kanal bewegt, wobei für einen effizienten Transport zusätzlich Kar2p und ATP benötigt werden. Beim Kar2p handelt es sich um ein Hsp70 homologes Protein, das sowohl *in vivo* als auch *in vitro* für den posttranslationalen Transport benötigt wird (Vogel *et al.*, 1990; Sanders *et al.*, 1992; Panzner *et al.*, 1995). Die ATP gebundene Form des Kar2p bindet an die im Lumen des ER liegende DnaJ homologe Domäne des Sec63p Proteins aus dem Sec62/63-Subkomplex und wird unter ATP-Hydrolyse mit geringer Sequenzspezifität auf die Polypeptidkette des zu translozierenden Proteins übertragen (Lyman und Schekman, 1997; Matlack *et al.*, 1997; Misselwitz *et al.* 1998).

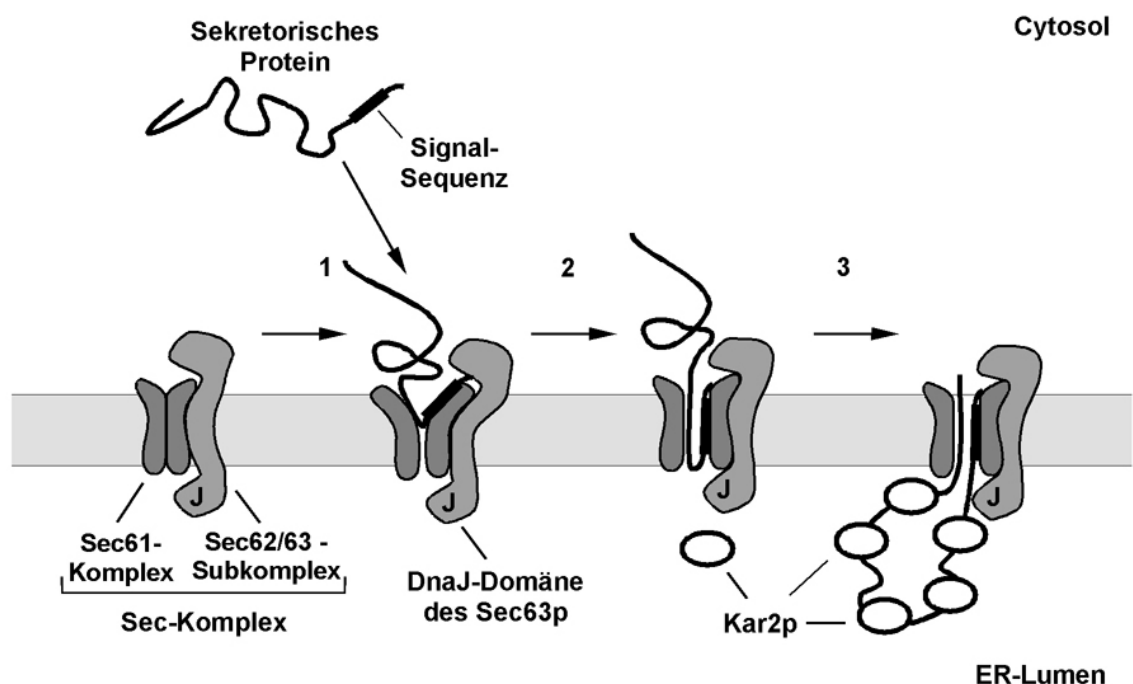


Abb. 3: **Modell des posttranslationalen Proteintransportes durch die ER-Membran der Hefe *S. cerevisiae*.** (1) Das zu transportierende Protein wird vollständig im Cytoplasma synthetisiert und durch cytosolische Chaperone in einem translokationskompetenten Zustand gehalten. Die Signalsequenz des Proteins wird in einem ATP und Kar2p unabhängigen Schritt vom Sec-Komplex erkannt und gebunden. (2) Der N-Terminus der Polypeptidkette inseriert vermutlich in Form einer Haarnadel in den vom Sec61-Subkomplex gebildeten Translokationskanal. (3) Die eigentliche Translokation der Polypeptidkette durch die ER-Membran erfolgt in einem ATP- und Kar2p- abhängigen Prozeß. Das luminal vorkommende Kar2p wird durch die DnaJ Domäne des Sec63p zur Bindung von Peptiden aktiviert. Sobald die zu transportierende Polypeptidkette auf der luminalen Seite der ER-Membran heraustritt, wird Kar2p unter ATP-Spaltung auf diese Bereiche übertragen, wodurch ein zurückgleiten der Kette verhindert wird (molekulare Ratsche). Durch das sukzessive Binden von weiteren Kar2p Proteinen wird die ungerichtete Brownsche Molekularbewegung der Polypeptidkette im Translokon in einen gerichteten Transportprozeß umgewandelt.

Für das Modellprotein PräPro- α -Faktor konnte *in vitro* gezeigt werden, daß der Transport durch die ER-Membran nach dem Prinzip der Brownschen Ratsche erfolgt (Matlack *et al.*, 1999). Das Transportsubstrat kann infolge der Brownschen Molekularbewegung im Translokonskanals frei in beide Richtungen diffundiert. Erst durch die Anlagerung des luminalen Kar2p an die Polypeptidkette entsteht ein gerichteter Transportprozeß, da im Lumen befindliche Bereiche der Polypeptidkette durch das gebundene Kar2p nicht mehr in den Kanal zurückgleiten können. Durch das sukzessive Binden von weiteren Kar2p Proteinen an die Polypeptidkette erfolgt der Transport des Proteins ins Lumen des ER.

2.1.3.1 Der Sec-Komplex

Der Sec-Komplex setzt sich aus dem trimeren Sec61-Komplex und dem tetrameren Sec62/63-Subkomplex zusammen (Abb. 4). Letzterer besteht aus den Proteinen Sec62p, Sec63p, Sec71p sowie Sec72p (Deshaies *et al.*, 1991; Panzner *et al.*, 1995; Wittke *et al.*, 1999). Während der Sec61-Komplex die Pore in der Membran bildet, übernimmt der Sec62/63-Subkomplex zusätzliche Funktionen, die für den posttranslationalen Transport benötigt werden. Defekte im Sec62/63-Subkomplex führen teilweise zur Akkumulation von Vorstufenproteinen im Cytosol. Der Verlust von *SEC62* oder *SEC63* ist lethal, Zellen mit delektiertem *SEC71* oder *SEC72* sind hingegen noch lebensfähig (Rothblatt *et al.*, 1989; Green *et al.*, 1992; Kurihara und Silver, 1993; Fang und Green, 1994).

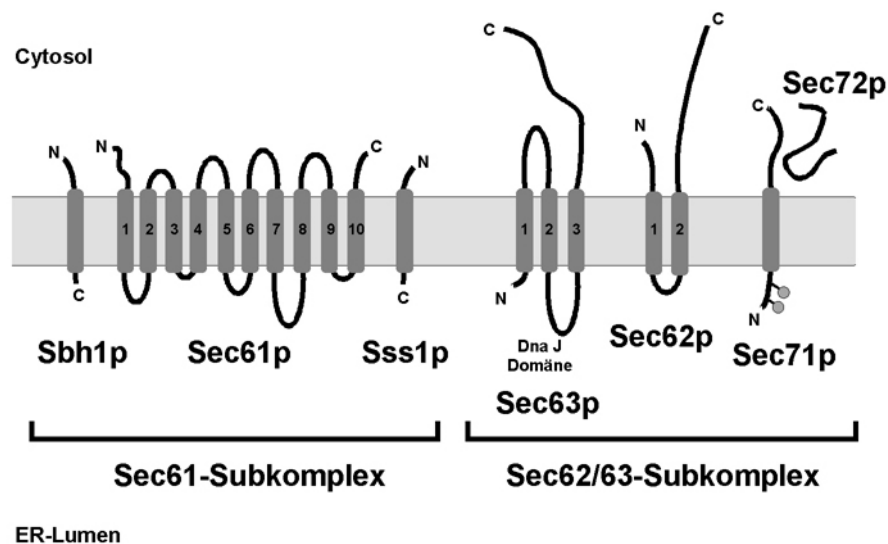


Abb. 4: **Schematische Darstellung des Sec-Komplexes der Hefe *S. cerevisiae*.**

Der heptamere Sec-Komplex setzt sich aus zwei Subkomplexen zusammen, dem trimeren Sec61-Komplex und dem tetrameren Sec62/63-Subkomplex. Die Transmembransegmente der Proteine sind als graue Zylinder dargestellt. Die DnaJ-homologe Domäne des Sec63p interagiert mit dem luminalen Chaperon Kar2p. Sec71p liegt als Glycoprotein in der Membran vor, was durch die angehefteten Kreise symbolisiert wird. Sec72p wird wahrscheinlich über die Bindung zum Glycoprotein Sec71p in der ER-Membran verankert.

Sec62p ist ein 32 kDa großes Protein und besitzt zwei Transmembranbereiche. Der C- sowie der N- Terminus des Proteins sind im Cytoplasma lokalisiert. Durch die eng beieinander liegenden Membrananker befindet sich der Hauptteil des Proteins im Cytosol. Sec62p ist essentiell für das Überleben der Hefezelle. Membranen einer temperatursensitiven Sec62-Mutante zeigen *in vitro* je nach Testsubstrat unterschiedlich starke Transportdefekte (Deshaies *et al.*, 1989,1990).

Sec71p ist ein integrales Membranprotein mit nur einem Transmembranbereich. Der N-Terminus des Proteins liegt im ER-Lumen und ist zweifach glycosyliert. Der $\Delta sec71$ Stamm ist lebensfähig, zeigt jedoch ein temperatursensitives Wachstum und *in vivo* Translokationsdefekte (Feldheim *et al.*, 1993; Fang und Green, 1994). Sec71p scheint für die Stabilität von Sec72p eine wichtige Rolle zu spielen, da im $\Delta sec71$ Stamm neben Sec71p auch kein Sec72p in der Membran nachzuweisen ist. Feldheim und Schekman (1994) konnten in diesem Zusammenhang zeigen, daß Sec72p mit einer Halbwertszeit von 12 min in der Zelle abgebaut wird, wenn Sec71p in der Membran fehlt.

Im Gegensatz zu den anderen Komponenten des Sec-Komplexes ist Sec72p kein Membranprotein. Das 21 kDa große Sec72p befindet sich auf der cytosolischen Seite der ER-Membran. Die Bindung zwischen Sec72p und den restlichen Komponenten des Sec-Komplexes ist sehr stark, selbst Hochsalz oder Alkali-Behandlung der Membran führt nicht zur Dissoziation von Sec72p vom restlichen Komplex (Feldheim *et al.*, 1994). Im Vergleich zum SEC71-Deletionsstamm, zeigt der SEC72 Deletionsstamm kein temperatursensitives Wachstum. Desweiteren sind auch die *in vivo* Translokationsdefekte schwächer ausgeprägt als im SEC71 Deletionsstamm (Fang und Green, 1994). In Quervernetzungsexperimenten konnte gezeigt werden, daß die C-terminale Hälfte der Signalsequenz des PräPro- α -Faktors während der Bindung an den Sec-Komplex mit Sec62p sowie Sec71p und Sec72p interagiert (Münsch *et al.*, 1992; Lyman und Schekman, 1997). In einem vom Lyman und Schekman (1997) vorgestellten Modell übernimmt Sec62p zusammen mit Sec71p und Sec72p dabei die Funktion einer Signalsequenzantenne für posttranslationale Transportsubstrate.

SEC63 wurde wie auch SEC61 und SEC62 als essentielles Gen in Screens auf Mutanten mit Defekten in der Translokation gefunden (Rothblatt *et al.*, 1989). Das 75 kDa große Sec63p besitzt drei Transmembranbereiche, wobei der N-Terminus des Proteins sich im Lumen des ER befindet und der C-Terminus im Cytoplasma. In der luminalen Schleife zwischen dem zweiten und dritten Membrananker befindet sich eine DnaJ-homologe Domäne (Sadler *et al.*, 1989; Feldheim *et al.*, 1992). Sec63p interagiert über seine DnaJ-Domäne mit dem luminal vorkommenden Hsp70 Homologen Kar2p und bildet so mit die Grundlage für den posttranslationalen Translokationsprozeß nach dem oben vorgestellten Prinzip der Brownschen Ratsche (Scidmore *et al.*, 1993; Matlack *et al.*, 1997, 1999).

Der Sec62/63 Subkomplex ist essentiell für den posttranslationalen Transport in der Hefe. Ng und Walter (1996) konnten interessanterweise zeigen, daß bestimmte Mutationen im SEC63 Gen oder die Deletion von SEC71 oder SEC72 in der Hefe nicht nur Translokationsdefekte hervorrufen, sondern außerdem die jeweiligen haploiden Hefezellen Defekte im Karyogamieverhalten aufweisen. Dabei handelt es sich um das Phänomen, daß nach der Verschmelzung von haploiden Zellen die Fusion der beiden Zellkerne gestört ist. Die Autoren gehen davon aus, daß die beobachteten Karyogamie-Defekte nicht primär auf Translokationsdefekte zurückzuführen sind, da Mutationen in Sec61p oder Sec62p die Zellkernfusion nicht beeinträchtigen.

Auch im Säugersystem werden bestimmte Proteine posttranslational durch die ER-Membran transportiert. Dabei handelt es sich vor allem um Proteine, die zu kurz sind, um während ihrer Synthese am Ribosom fest mit SRP interagieren zu können (Schlenstedt und Zimmermann, 1987; Müller und Zimmermann, 1988; Zimmermann *et al.*, 1990; Klappa *et al.*, 1991).

Bisher konnten jedoch noch keine zum Sec62/63-Subkomplex analogen Komponenten im Säuger isoliert werden. Die Existenz von ähnlichen Strukturen wie dem Sec-Komplex in höheren Eukaryonten ist jedoch wahrscheinlich. So wurde in der Fruchtfliege *D. melanogaster* das Protein Dtrp1 (**D**rosophila **t**ranslocation **p**rotein 1) identifiziert, das nicht nur ein struktur-, sondern sogar auch ein funktionshomologes Protein zum Sec62p der Hefe darstellt (Noel und Cartwright, 1994).

In *E. coli* erfolgt der posttranslationale Transport von Proteinen durch die Plasmamembran mittels des SecYEG-Komplex und der cytosolisch orientierten ATPase SecA. Das SecA Protein besitzt dabei keinerlei Homologien zu den Untereinheiten des Sec62/63-Subkomplexes. SecA bindet an das Transportsubstrat und schiebt es durch eine Konformationsänderung in den SecYEG-Komplex. Durch die wiederholte Insertion von SecA in die Membran wird das Transportsubstrat dann schrittweise in den periplasmatischen Raum transportiert. Die für den Transportprozeß benötigte Energie wird durch ATP-Hydrolyse bereitgestellt (Joly und Wickner, 1993; Economou und Wickner, 1994; Economou *et al.*, 1995).

2.1.4 Posttranslationale Modifikationen der Polypeptidkette

Noch während des Transportprozesses durch die ER-Membran wird die Polypeptidkette modifiziert. Sobald die Signalsequenzschnittstelle in das Lumen des ER gelangt, wird das Signalpeptid durch den Signalpeptidase-Komplex (SP-Komplex) spezifisch vom eigentlichen Protein abgespalten. Die Abspaltung der hydrophoben Signalsequenz vom eigentlichen Protein ist für die Zelle essentiell, der Verlust der Signalpeptidaseaktivität führt zum Tod der Zelle (Böhni *et al.*, 1988; Dalbey *et al.*, 1997).

Eine weitere Form der Modifikation im ER-Lumen ist die kovalente Anheftung von Zuckermolekülen an ausgewählte Proteine. Die N-glycosidische Kopplung von Oligosacchariden an die Polypeptidkette wird durch den Oligosaccharyltransferase-Komplex (OST-Komplex) vermittelt. Das Oligosaccharid wird enzymatisch auf einen Asparaginrest übertragen, der in der Sequenzfolge Asn-X-Ser oder Asn-X-Thr im Polypeptid vorkommt (X steht dabei für eine beliebige Aminosäure außer Prolin). Die Anheftung der Oligosaccharide erfolgt noch während der Translokation des Proteins durch die ER-Membran, wodurch sichergestellt wird, daß die zu glycosylierenden Stellen für den OST-Komplex optimal zugänglich sind (Kornfeld und Kornfeld., 1985; Varki, 1993; Mellquist *et al.*, 1998; Knauer und Lehle, 1999).

2.1.4.1 Der Signalpeptidase-Komplex

Die Signalpeptidase spaltet im Lumen des ER das Signalpeptid von der restlichen Polypeptidkette ab. Im Säuger setzt sich das Enzym aus fünf Membranproteinen zusammen (Abb. 5). Die Untereinheiten SPC12, SPC18, SPC21, SPC22/23 und SPC25 wurden jeweils nach ihren molaren Größen in der SDS-PAGE benannt (Evans *et al.*, 1986). Drei Proteine, SPC18, SPC21 und SPC22/23 besitzen jeweils nur ein Transmembransegment, wobei der N-Terminus im Cytosol und der Großteil des Proteins zusammen mit dem C-Terminus im Lumen des ER lokalisiert ist. Bei SPC18 und SPC21 handelt es sich um fast identische Proteine, sie stellen mit 80 % übereinstimmenden Aminosäuren Isoformen zueinander dar. SPC22/23 ist ein Glycoprotein, das im SDS-PAGE als Doppelbande bei 22 kDa und 23 kDa läuft. Die Masse von SPC22/23 ohne Glycosylierung beträgt 19 kDa (Shelness und Blobel, 1990; Gregory *et al.*, 1993). Die Untereinheiten SPC25 und SPC12 besitzen je zwei Transmembransegmente, wobei die C- und N-Termini der Proteine im Cytoplasma lokalisiert sind. Desweiteren ist der Abstand zwischen den Membranankern in beiden Proteinen so gering, daß SPC25 und SPC12 kaum luminale Bereiche besitzen (Kalies und Hartmann, 1996). SPC18 und SPC21 sind vermutlich Bestandteile des aktiven Zentrums der Signalpeptidase (siehe weiter unten).

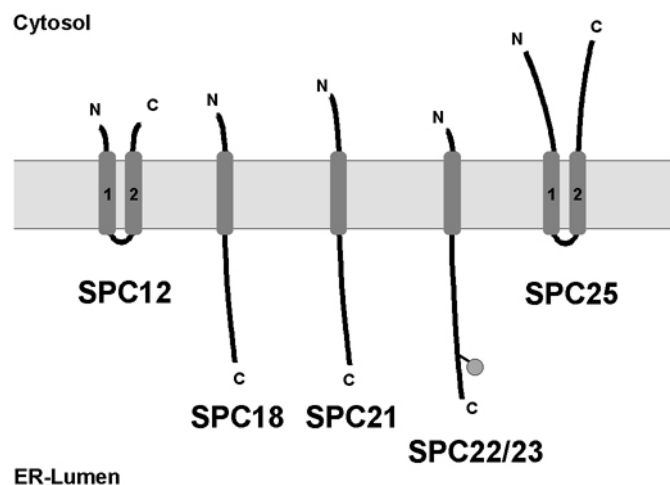


Abb. 5: **Schematische Darstellung des ER-Signalpeptidase-Komplexes aus Säugerzellen.**

Der Komplex besteht im Säuger aus fünf Membranproteinen. Die Transmembransegmente der Proteine sind als graue Kästen dargestellt. SPC22/23 liegt als Glycoprotein vor, was durch den angehefteten Kreis symbolisiert wird.

Außer im Säuger wurde die Signalpeptidase auch im Vogel und in der Hefe näher analysiert. Aus Huhn-Oviduktzellen wurde ein Signalpeptidase-Komplex gereinigt, der nur aus den zwei Membranproteinen gp23 und p19 besteht. gp23 ist homolog zur Säuger-Untereinheit SPC22/23 und p19 ist homolog zu SPC18 (Baker und Lively, 1987; Lively *et al.*, 1994).

Auch die Hefe *S. cerevisiae* besitzt einen heteromeren Signalpeptidase-Komplex (SP-Komplex) (YaDeau *et al.*, 1991). Zu Beginn der vorliegenden Arbeit waren zwei Proteine Sec11p und Spc1p charakterisiert. Das zur Säuger-Untereinheit SPC18 homologe Sec11p ist direkt an der Signalpeptidabspaltung beteiligt. Bestimmte Mutationen im Sec11p führen zur Akkumulation von Präkursoren, und der Verlust des Gens ist für die Hefezelle lethal (Böhni *et al.*, 1988). Das nicht essentielle Spc1p ist homolog zur SPC12 Untereinheit des Säugers. Spc1p kann teilweise eine temperatursensitive *SEC11* Mutante supprimieren, außerdem konnte biochemisch gezeigt werden, daß Spc1p mit Sec11p in einem Komplex vorliegt (Fang *et al.*, 1996).

Alle Signalpeptidasen, die N-terminale Signalpeptide abspalten, werden in der Gruppe der Typ I Signalpeptidasen zusammengefaßt. Dazu gehören unter anderem die bakteriellen Leaderpeptidasen, die mitochondrialen Signalpeptidasen der inneren Membran sowie die ER-Signalpeptidasen. Die Substratspezifität der Typ I Signalpeptidasen ist stark konserviert: prokaryontische Leaderpeptidasen können Signalsequenzen von eukaryontischen Transportsubstraten abspalten, so wie auch umgekehrt eukaryontische Signalpeptidasen prokaryontische Transportsubstrate prozessieren (Talmadge *et al.*, 1980; Lingappa *et al.*, 1984; Dalbey *et al.*, 1997). Im Gegensatz zu den eukaryontischen Signalpeptidasen bestehen jedoch die prokaryontischen Leaderpeptidasen jeweils nur aus einem Membranprotein, deren bekanntester Vertreter die Leaderpeptidase LepB aus *E. coli* ist (Zwizinski und Wickner, 1980). Sequenzvergleiche ergaben, daß mehrere Regionen im Hefe Sec11p sowie auch in den Säuger-Untereinheiten SPC21 und SPC18 Homologien zur bakteriellen Leaderpeptidase aufweisen (van Dijk *et al.*, 1992). Mittels Punktmutations-Studien an prokaryontischen Leaderpeptidasen konnte gezeigt werden, daß ein konservierter Serin-Rest sowie ein Lysin-Rest essentiell für die Spaltungsaktivität sind. Die Kristallstrukturanalyse der Leaderpeptidase aus *E. coli* ergab, daß Serin 90 zusammen mit Lysin 145 das aktive Zentrum der Peptidase bildet (Black, 1993; Paetzel *et al.*, 1997; Sung und Dalbey, 1992; Tschantz *et al.*, 1993; Paetzel *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu klassischen Serin-Proteasen fungiert in den Leaderpeptidasen wahrscheinlich Lysin anstelle von Histidin als Base bei der Spaltungsreaktion. Interessanterweise ist in den eukaryontischen ER-Signalpeptidasen zwar der Serin-Rest konserviert, jedoch befindet sich im Sequenz-Alignment in der Position des Lysin ein Histidin (Dalbey *et al.*, 1997). Punktmutations-Studien an Sec11p ergaben außerdem, daß keines der im Protein vorkommenden Lysine essentiell für die Spaltungsaktivität ist. Als essentiell für die Spaltung wurden hingegen Serin 44, Histidin 83, Asparaginsäure 103 und Asparaginsäure 109 identifiziert, was eher für eine klassische Serin-Protease spricht (van Valkenburgh *et al.*, 1999). Bemerkenswert ist jedoch in diesem Zusammenhang, daß die ER-Signalpeptidasen von keinem der klassischen Serin-Protease-Inhibitoren inhibiert werden (Jackson und Blobel, 1980).

2.2 Zielsetzung

In den letzten Jahren gelang es, die Hauptkomponenten der im rauhen ER befindlichen Translokationsapparate (Translokons) zu identifizieren. Bei vielen der gefundenen Subkomplexe des Translokons ist inzwischen bekannt, an welchen generellen Teilschritten des Proteintransportes sie beteiligt sind. Der posttranslationale Transport von löslichen Proteinen wurde vor allem in der Hefe *S. cerevisiae* untersucht, wohingegen der cotranslationale Transport von löslichen und Membranproteinen hauptsächlich im Säuger analysiert wurde. Ein Vergleich der eukaryontischen ER-Translokationsapparate aus Hefe und Säuger zeigt, daß viele der bekannten Subkomplexe konserviert in beiden Organismen vorkommen. Es gibt aber auch Komponenten, die bisher nur exklusiv in einer der beiden Spezies identifiziert wurden. Zu diesen Subkomplexen gehören in der Hefe der Sec-Komplex sowie im Säuger das TRAM-Protein als auch der TRAP-Komplex. Desweiteren kennt man Subkomplexe wie z.B. die Signalpeptidase, die zwar in beiden Organismen vorkommen, deren Untereinheitenkomposition jedoch variiert.

Ziel dieser Arbeit war es, in der Hefe sowie im Säuger neue Faktoren des ER-Translokons zu isolieren, wobei nach Subkomplexen bzw. Untereinheiten von Subkomplexen gesucht werden sollte, die bisher nur in einem der beiden Modellorganismen beschrieben worden sind. Im Säuger sollte nach Komponenten gesucht werden, die an posttranslationalen Translokationsprozessen beteiligt sein könnten. Im Gegensatz zur Hefe *S. cerevisiae* ist im Säuger bisher vollkommen unklar, wie und mit welchen Faktoren der posttranslationale Transport über die ER-Membran vonstatten geht. Da der Sec61-Komplex die zentrale Pore für den posttranslationalen sowie den cotranslationalen Translokationsprozeß in der Hefe bildet, ist es wahrscheinlich, daß auch im Säuger der posttranslationale Transport von Proteinen über den Sec61-Komplex erfolgt. Mittels biochemischer Methoden sollte untersucht werden, ob ribosomenfreier Sec61-Komplex (ähnlich wie in der Hefe) mit anderen Proteinen assoziiert ist. Anschließend sollten die assoziierten Proteine identifiziert und näher charakterisiert werden, wobei der Frage nachgegangen werden sollte, ob im Säuger eine dem Sec-Komplex der Hefe ähnliche Struktur existiert.

In der Hefe *S. cerevisiae* sollte der Signalpeptidase-Komplex näher untersucht werden. Im Säuger besteht der Komplex aus fünf Untereinheiten, in der Hefe sind bisher nur zwei Untereinheiten bekannt. Um neue Untereinheiten in der Hefe zu identifizieren sollte die ER-Signalpeptidase biochemisch aufgereinigt und die enthaltenen Proteine ansequenziert werden. Anschließend sollten neu gefundene Untereinheiten durch genetische sowie biochemische Methoden näher charakterisiert werden, um so neue Einblicke in die Funktionsweise der eukaryontischen Signalpeptidasen zu erlangen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien, Enzyme und Medien

Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Merck, Serva, BioRAD, Boehringer Mannheim, Fluka oder Sigma bezogen. Säulenmaterialien zur Proteinaufreinigung oder Nachreinigung von Detergenzien waren von Pharmacia, BioRAD und Sigma. Restriktionsendonukleasen und andere DNA modifizierende Enzyme waren von New England Biolabs oder Boehringer Mannheim. Für Bakterien- und Hefemedien wurden Substanzen von Difco, Gibco-BRL und Merck eingesetzt.

3.1.2 Puffer und Lösungen

Aufgrund der Vielzahl von verwendeten Puffern wurde eine Kurzschreibweise eingeführt. Den am häufigsten benutzten Chemikalien wurden Buchstabenkürzel zugeordnet, wobei die tiefgestellten Zahlen jeweils die verwendeten Konzentrationen wiedergeben. Die einzeln verwendeten Puffer und Lösungen sind jeweils im Methoden bzw. Ergebnisteil der Arbeit aufgeführt.

H_a	a mM Hepes pH 7,8
Dig_b	b % (w/v) Digitonin
dBC_c	c % (w/v) DeoxyBigChap
T_d	d % (v/v) Triton x-100
K_e	e mM Kaliumacetat
Mg_f	f mM Magnesiumacetat
Gly_g	g % (v/v) Glycerin
S_h	h mM Saccharose
E_i	i mM EDTA
β-Me_j	j mM β-Mercaptoethanol
DTT_k	k mM DTT
Pi	Protease Inhibitor Mix 1:1000 eingesetzt, bestehend aus: 10 mg/ml Leupeptin (Boehringer) 2 mg/ml Pepstatin (Sigma) 5 mg/ml Chymostatin (Boehringer)

3.1.3 Detergenzien

Detergenzien wurden bezogen von Calbiochem (DeoxyBigChap), Merck (Digitonin), BHM (Natriumdodecylsulfat (SDS)), Roth (Saponin) und Sigma (Digitonin, Triton X-100 und Tween 20). Detergenzien aus Naturprodukten wurden vor ihrer Verwendung einer weiteren Reinigungsprozedur unterzogen, wobei Digitonin nach Görlich *et al.* (1992a) und Saponin nach Panzner *et al.* (1995) aufgearbeitet wurde.

3.1.4 Lipide

Lipidgemische aus Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylethanolamin (PE) im Verhältnis 4 zu 1 wurden nach Görlich und Rapoport (1993) präpariert. Die Endkonzentrationen betrugen 16 mg/ml PC, 4 mg/ml PE, in 50 mM Hepes pH 7,5; 16 % (v/v) Glycerin, 10 mM DTT und 3 % (w/v) DeoxyBigChap. Beide Lipide wurden von Sigma bezogen.

3.1.5 Versuchsorganismen

3.1.5.1 Escherichia coli Stämme

M15 [pREP4]	NaIS, StrS, rifS, lac ⁻ , ara ⁻ , gal ⁻ , mtl ⁻ , F ⁻ , recA ⁺ , uvr ⁺ , [pREP4(kanamycinR)] (Qiagen)
Top 10	mcrA, D(mrr-hsdRMS-mcrBC), F80, DlacDM15, D1acX74, dcoR, rec A1, araD139 D(ara,leu) 7697 galU, galK L-rpsL (streptomycinr) end A1, nupG (Invitrogen Corporation)

3.1.5.2 Saccharomyces cerevisiae Stämme

DF5	mat α/a ; trp1-1(am)/trp1-1(am); leu2-3,112/leu2-3,112; ura3-52/ura3-52; his3- Δ 200/his3- Δ 200; lys2-801/lys2-801 (Meyer und Hartmann, 1997)
HFY401	mat α ; Δ spc1::TRP1; ade2-101; his3- Δ 200; leu2-3,112; lys2-801; trp1- Δ 901; ura3-52 (Fang et al., 1996)
HFY403	mat α ; Δ spc2::URA3; his3- Δ 200; leu2-3,112; lys2-801; trp1- Δ 901; ura3-52 (Mullins et al., 1996)
HFY404	mat α ; Δ spc1::TRP1; Δ spc2::URA3; ade2-101; his3- Δ 200; leu2-3,112; trp1- Δ 901; ura3-52 (Mullins et al., 1996)
HMY1	mat a; Δ spc3 trp1-1(am); leu2-3,112; ura3-52; his3- Δ 200; lys2-801 (diese Arbeit)
HMY2	mat α ; Δ sec11::Leu; trp1-1(am); leu2-3,112; ura3-52; his3- Δ 200; lys2-801 (diese Arbeit)
SEY6210	mat a; his3- Δ 200; leu2-3,112; lys2-801; suc2- Δ 9; trp1- Δ 901;; ura3-52 GAL (Robinson et al., 1988)

3.1.5.3 Säugetiere

Zur Aufreinigung von Membranfraktionen wurden Gewebe aus Hund (Canis familiaris), Maus (Mus musculus), Ratte (Rattus norvegicus) und Rind (Bos taurus) verwendet.

3.1.6 Antikörper

Die Affinitätsaufreinigung von peptidspezifischen polyklonalen Antikörpern aus Kaninchenantisera erfolgte nach Görlich *et al.* (1992). Folgende Antikörper wurden verwendet:

Hefe-Proteine	Antigene Peptidsequenz	Quelle
Kar2p	rekombinantes Protein	Panzner <i>et al.</i> (1995)
Sbh1p	CPTPPGGQRTLQKRK	Panzner <i>et al.</i> (1995)
Sbh2p	AASVPPGGQRICO	Finke <i>et al.</i> (1996)
Sec11p (N-terminal)	MNLRFELQKC	diese Arbeit
Sec61p (C-terminal)	CLVPGFSDLM	Panzner <i>et al.</i> (1995)
Sec62p	CNKKKAINEKAQN	Panzner <i>et al.</i> (1995)
Sec72p	rekombinantes Protein	C. Unger (Berlin)
Spc1p (C-terminal)	CKIEINVDQYD	diese Arbeit
Spc1p (N-terminal)	MSEILQDYQRKLC	diese Arbeit
Spc2p	CHNVLDTKKNE	diese Arbeit
Spc3p	rekombinantes Protein	diese Arbeit
Ssh1p	CNQVLGVPGAM	Finke <i>et al.</i> (1996)
Säuger-Proteine	Antigene Peptidsequenz	Quelle
Sec61 α	CKEQSEVGSMGALLF	Görlich <i>et al.</i> (1993)
Sec61 β	PGPTPSGTNC	Görlich <i>et al.</i> (1992)
Sec62 (C-terminal)	CTPKSSHEKS	diese Arbeit
Sec63	CTNKNRTKGGWQQKSKGPKKT	diese Arbeit
Sec63	<i>rekombinantes Protein</i>	diese Arbeit
SPC25	CHDSLATERKIK	Kalies & Hartmann (1996)
SRPR α	KKFEDSEKAKKPVRC	Labor Hartmann
TRAM	CADSPRNKEKSS	Görlich <i>et al.</i> (1992)
TRAP α	CLPRKRAQKRSVGSDE	Prehn <i>et al.</i> (1989)

3.1.7 Plasmide

pCBsec11::LEU	Plasmid enthält ein Deletionskonstrukt zur Deletion des <i>SEC11</i> Gens. Böhni <i>et al.</i> (1988)
pGal10Spc2	<i>SPC2</i> unter Kontrolle eines Gal10 Promotors im Plasmid pRS414. diese Arbeit
pGal10Spc3	<i>SPC3</i> unter Kontrolle eines Gal10 Promotors im Plasmid pRS414. diese Arbeit
pMet3Sec11	<i>SEC11</i> unter Kontrolle eines Met3 Promotors im Plasmid pRS426. diese Arbeit
pMPY-3xHA	Templateplasmid zur Erzeugung eines PCR Deletionskonstruktes nach Schneider <i>et al.</i> (1995) Schneider <i>et al.</i> (1995)
pRS414	<i>E. coli/S. cerevisiae</i> Vektor, ausgestattet mit einem Tryptophan-Markergen und einem ARS-CEN Replikationselement für Hefe. Sikorski <i>et al.</i> (1989)
pRS426	<i>E. coli/S. cerevisiae</i> Vektor, ausgestattet mit einem Uracil-Markergen und einem 2 μ Replikationselement für Hefe. Sikorski <i>et al.</i> (1989)
pSP65αF	<i>E. coli</i> Vektor mit dem PräPro- α -Faktor Gen hinter einem SP6-Promotor Rothblatt <i>et al.</i> , (1987)
pQE30	<i>E. coli</i> Expressionsvektor für N-terminale His ₆ -Fusionsproteine. Qiagen GmbH

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde entweder nach der Methode von Birnboim und Doly (1979) oder mit dem Qiagen-Plasmid-Kit nach der Vorschrift des Herstellers isoliert. Das Schneiden von DNA mit Endonukleasen, die Ligation von DNA-Fragmenten und andere Grundtechniken der molekularen Genetik erfolgten nach Sambrook *et al.* (1989). Die Transformation von *Escherichia coli* mit Plasmid-DNA erfolgte durch Elektroporation (Dower *et al.*, 1988). Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurde zur Amplifikation von DNA-Fragmenten benutzt. Je nach Anwendung wurde *Pfu*-Polymerase (Klonierung von PCR-Produkten) von Stratagene oder *Taq*-Polymerase (analytische PCR) von Boehringer Mannheim verwendet. Zur Sequenzierung von DNA wurde anfangs das „fmol-PCR-Sequenzierungskit“ von Promega und später das „Thermo Sequenase Fluoreszenzkit“ von Amersham benutzt.

3.2.2 Hefegenetische Methoden

3.2.2.1 Transformation von *S. cerevisiae* mit Plasmid-DNA.

S. cerevisiae Zellen wurden unter Zugabe von Polyethylenglykol und Lithiumacetat nach der Methode von Gietz und Schiestl (1991) transformiert.

3.2.2.2 Herstellung von Hefe-Deletionsmutanten

Die von Schneider *et al.* (1995) entwickelte Methode, um Hefe-Gene mit einem Protein-Tag zu versehen, wurde so modifiziert, daß sie sich auch zur Deletion von ganzen Genen eignet. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, daß nach erfolgreicher Deletion des gewünschten Gens der Selektionsmarker wieder aus dem Genom entfernt werden kann.

Im folgenden ist die Prozedur für die Deletion des Hefe Gens *SPC3* beschrieben: Mittels PCR wurde aus dem Plasmid pMPY-3xHA ein Fragment amplifiziert, welches ein *URA3* Gen enthielt, das an beiden Enden von einem 3xHA-Tag und 40 bp komplementär zur Start- bzw. Endregion von *SPC3* flankiert wurde (Abb. 6 A). Der diploide Hefestamm DF5 wurde mit dem PCR-Fragment nach der Lithiumacetat-Methode transformiert und auf Uracil-freien Selektionsplatten ausplattiert. Über die homologen Flanken konnte eine Rekombination in einen der beiden chromosomalen Genorte von *SPC3* stattfinden, wobei das *SPC3* Gen durch das *URA3* Gen ersetzt wurde (Abb. 6 B). Damit für weitere Selektionsexperimente der *URA3*-Marker wieder zur Verfügung stand, wurden positive Transformanten auf Uracil haltiges Medium überführt, wobei ein Teil der Zellen durch ein Rekombinationsereignis zwischen den beiden flankierenden 3xHA-Tags das *URA3* Gen verlor. Auf den Verlust des Uracil-Markergens konnte mit Hilfe von 5-Fluor Orotsäure (5-FOA) gezielt selektioniert werden (Boeke *et al.* 1987) (Abb. 6 C). Der erhaltene diploide Stamm mit einem deletierten *SPC3* Locus wurde anschließend für 2 Tage sporuliert und die vereinzelt Sporen 5 Tage bei 30 °C auf Vollmedium angezogen (Abb. 6 D).

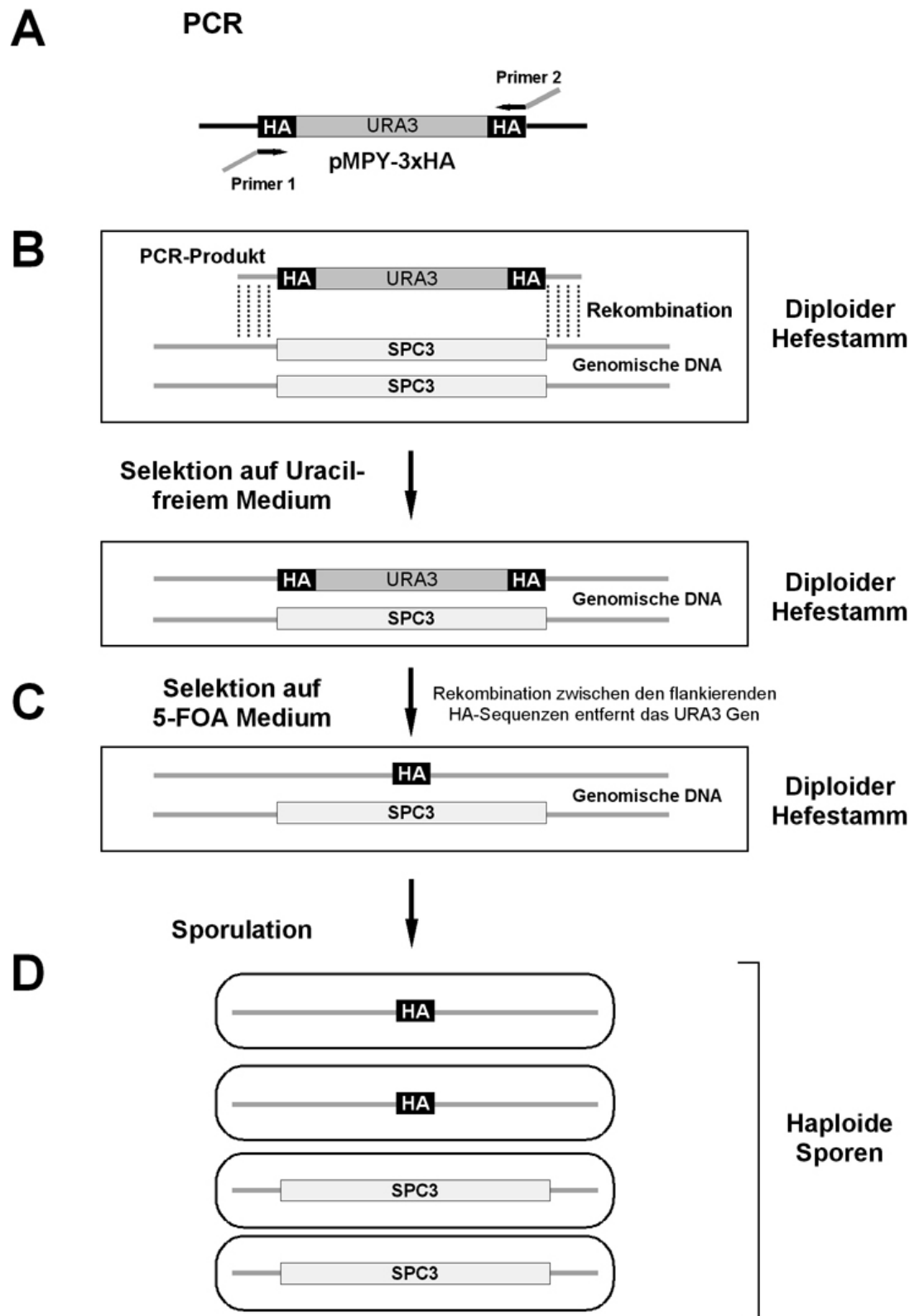


Abb. 6: **Herstellung einer *SPC3*-Deletionsmutante.**
Schematische Darstellung der Methode zur Deletion von *SPC3* aus einem diploiden Hefestamm.
Beschreibung siehe Text.

3.2.3 Proteinanalytische Methoden

3.2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine können entsprechend ihres Molekulargewichtes mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt werden (Laemmli, 1970). Die aufzutrennenden Proteinproben wurden vor dem Auftrag 10 bis 15 min bei 65 °C in SDS-Probenpuffer (2 % (w/v) SDS, 60 mM Tris Base, 10 % (v/v) Glycerol und 50 mM DTT) denaturiert. Als Gelelektrophoresepuffer wurde 25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS verwendet, der Lauf erfolgte bei 50 mA. Nach der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine entweder auf Nitrocellulose übertragen (Westernblot) oder mit 10 %iger (w/v) Essigsäure fixiert (Coomassiefärbung oder Autoradiographie).

3.2.3.2 Coomassiefärbung

SDS-Gele wurden kurz in 10 % (v/v) Essigsäure fixiert und dann mit Coomassiefärbelösung (2 g/l Coomassie Brilliant Blue R250 in 20 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure) gefärbt. Entfärbt wurde mit demselben Gemisch, jedoch ohne Farbstoff.

3.2.3.3 Autoradiographie

SDS-Gele wurden kurz in 10 % (v/v) Essigsäure fixiert, danach in H₂O gewässert und mit Hilfe eines Vakuumtrockners auf Papier getrocknet. Die im Gel enthaltene Radioaktivität wurde anschließend durch auflegen eines Röntgenfilms (Kodak) oder einer Phosphorimagerplatte (Fuji) detektiert.

3.2.3.4 Westernblot

Proteine wurden zur weiteren Untersuchung von SDS-Polyacrylamidgelen entsprechend Görlich *et al.* (1992a) auf Nitrocellulose (0,45 µm Porengröße) oder Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membranen transferiert. Die übertragenen Proteine wurden entweder durch Immunfärbung mit Antikörpern sichtbar gemacht, oder einzelne Proteinbanden wurden ausgeschnitten und einer Aminosäuresequenzierung (Edman-Abbau) unterworfen. Immunoblotanalysen wurden entsprechend Görlich *et al.* (1992a) durchgeführt, wobei das ECL-Nachweissystem (Amersham oder NEN) verwendet wurde. Handelte es sich bei den Proben um Immunopräzipitations-Experimente, so wurde anstelle von sekundären anti-Rabbit-Antikörpern Protein A Peroxidase (Sigma) verwendet.

3.2.4 Biochemische Methoden

3.2.4.1 In vitro Transkription und Translation

Für Aktivitätsmessungen der Signalpeptidase wurde das Vorstufenprotein des α -Faktors (PräPro- α -Faktor) (Kurjan und Herskowitz, 1982) mit [³⁵S] L-Methionin radioaktiv markiert. Dazu wurde *in vitro* zuerst die entsprechende mRNA transkribiert und anschließend das dazugehörige Protein translatiert. Das für das α -Faktor-Vorstufenprotein kodierende Plasmid pSP65 α F (Rothblatt *et al.*, 1987) wurde mit der Restriktionsendonuklease *Sa*I linearisiert und anschließend mit dem Transkriptionssystem von Promega und SP6-RNA-Polymerase die mRNA transkribiert. Die Translation der Transkripte erfolgte in Anwesenheit von [³⁵S] L-Methionin für 45 min bei 30 °C im Retikulozyten-Lysat von Promega. Anschließend wurde die Synthese durch Zugabe von 2 mM Cycloheximid gestoppt und die Ribosomen durch Zentrifugation (10 min bei 100.000 rpm im TLA100-Rotor) abgetrennt. Der Überstand wurde mit 70 % (w/v) Ammoniumsulfatlösung gefällt. Das resultierende Pellet wurde in Wasser resuspendiert und anschließend einer TCA-Fällung unterzogen um dann in 1 % (w/v) SDS aufgenommen zu werden.

3.2.4.2 In vitro Signalpeptidase Spaltungsassay

Zum Nachweis der enzymatischen Aktivität der Signalpeptidase wurde ein modifizierter *in vitro* Spaltungsassay nach YaDeau *et al.* (1989) verwendet. Aus Zellen der zu untersuchenden Hefestämme wurden raue Mikrosomen (RM) präpariert und auf gleiche Mengen Sec62p normalisiert. Digitoninextrakt entsprechend 20 eq RM wurde nach Panzner *et al.* (1995) hergestellt und mittels eines Ausgleichspuffers auf 50 mM Triethanolamin, pH 8,0; 1 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylsäurefluorid), 0,32 mg/ml PC; 0,08 mg/ml PE; 120 mM KAc und 0,2 % (w/v) Digitonin eingestellt. Als Substrat wurde [³⁵S] markierter PräPro- α -Faktor hinzugegeben und 2 Stunden bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben gefällt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe eines Phosphorimagers (Fuji BAS2000) die Menge an prozessiertem α -Faktor bestimmt.

3.2.4.3 N-Glycosidase F Spaltungsassay und ConA-Blot

Der Nachweis von Glycoproteinen im Signalpeptidase-Komplex erfolgte durch N-Glycosidase F Behandlung oder durch Westernblot mit ConA Peroxidase (Sigma). 15 μ l aufgereinigter Hefe SP-Komplex (entsprechend 500 eq Ausgangs-RM) wurde für 5 min bei 62 °C in 1 % SDS inkubiert, anschließend wurden 85 μ l H₂O E₁₂ T₁ β -Me₄ hinzugegeben sowie 1 Unit N-Glycosidase F (Boehringer Mannheim). Die Probe wurde 8 Stunden bei 37 °C inkubiert und danach mittels SDS-PAGE und Immunoblot analysiert.

Beim ConA-Blot wurde der aufgereinigte Hefe SP-Komplex (entsprechend 500 eq Ausgangs-RM) im SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Die nicht geblockte Membran wurde danach mit Concanavalin A (ConA), das an eine Peroxidase gekoppelt war, inkubiert. Nach intensivem Waschen der Nitrocellulosemembran wurden die Glycoproteine mit Hilfe des ECL-Nachweissystem detektiert.

3.2.4.4 Protein-Quervernetzung mittels Bismaleinimidhexan

Bismaleinimidhexan (BMH) ist ein homobifunktionelles Quervernetzungsreagenz, bei dem zwei reaktive Maleinimidgruppen durch ein Hexanskelett von 1,6 nm Länge verbunden sind. BMH kann eingesetzt werden, um reduzierte Cysteine quervernetzen. Rauhe Mikrosomen aus Säugergewebe in H₅₀ K₁₅₀ M₅ S₂₀₀ Pi wurden mit 50 μ M Bismaleinimidhexan (Pierce) (Stocklösung 1 mM Bismaleinimidhexan in Dimethylformamid) für 25 min bei 0 °C inkubiert. Anschließend wurde die Quervernetzungsreaktion durch Zugabe von 280 mM β -Mercaptoethanol gestoppt.

3.2.5 Proteinbiochemische Methoden

3.2.5.1 Herstellung von rauen Mikrosomen sowie Puromycin/Hochsalz behandelten rauen Mikrosomen

Die Präparation von rauen Mikrosomen (RM) aus Hunde- oder Rinderpankreasgewebe erfolgte nach Görlich und Rapoport (1993). Rauhe Mikrosomen aus *S. cerevisiae* wurden entsprechend Panzner *et al.* (1995) präpariert. Von Ribosomen befreite RM (PK-RM) wurden durch Puromycin und Hochsalzbehandlung nach der Methode von Görlich und Rapoport (1993) hergestellt.

3.2.5.2 Zellfraktionierung

Zellfraktionierung zur Gewinnung von glatten und rauen ER-Membranen aus Lebergewebe wurde entsprechend Kreibich *et al.* (1978) durchgeführt. 10 g Rinderleber wurden im Verhältnis 1 zu 10 (w/v) mit dem Puffer H₅₀ K₂₅ Mg₅ S₂₅₀ β -Me₅ Pi in einem Teflon-Homogenisator homogenisiert. Nicht aufgeschlossenes Material wurde durch Zentrifugation (13 min bei 1.750 rpm, Sigma 3K12 Zentrifuge) abgetrennt. Der resultierende Überstand wurde 13 min bei 3.850 rpm (Sigma 3K12 Zentrifuge) zentrifugiert, wobei Kerne und Zellbruchstücke sedimentieren. Mitochondriales Material wurde anschließend aus dem Überstand durch Zentrifugation für 10 min bei 17.000 rpm (Ti-60 Rotor) abgetrennt.

Die im postmitochondrialen Überstand enthaltenen rauhen und glatten ER-Membranen lassen sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte voneinander trennen. Der postmitochondriale Überstand wurde dazu auf 1,35 M Saccharose und $H_{50} K_{25} Mg_5 \beta\text{-Me}_5 \text{ Pi}$ eingestellt und auf einen Stufengradienten bestehend aus 1,5 M Saccharose in $H_{50} K_{25} Mg_5 \beta\text{-Me}_5 \text{ Pi}$ und 2,0 M Saccharose in $H_{50} K_{25} Mg_5 \beta\text{-Me}_5 \text{ Pi}$ gelegt. Anschließend wurde der Gradient überschichtet mit 1,0 M Saccharose in $H_{50} K_{25} Mg_5 \beta\text{-Me}_5 \text{ Pi}$ und für 17 Stunden bei 45.000 rpm (Ti45-Rotor) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die rauhen ER-Membranen aus der 1,5 - 2,0 M und die glatten ER-Membranen aus der 1,35 - 1,0 M Interphase abgenommen und jeweils mit 1 Volumen Puffer $H_{50} K_{25} Mg_5 \beta\text{-Me}_5 \text{ Pi}$ verdünnt. Durch Zentrifugation für 2 Stunden bei 45.000 rpm (Ti45-Rotor) wurden die Membranfraktionen pelletiert und jeweils in gleichen Mengen Puffer $H_{50} K_{25} Mg_5 S_{250} \beta\text{-Me}_5 \text{ Pi}$ aufgenommen.

3.2.5.3 Saccharose-Gradienten-Zentrifugation

Saccharose-Gradienten-Zentrifugation zur Auftrennung von in Detergenz gelösten Proteinen wurde ähnlich zu Görlich *et al.* (1992a) durchgeführt. 50 eq raue Mikrosomen aus Rind wurden mit 2 % (w/v) Digitonin oder 1 % (w/v) DeoxyBigChap in $H_{50} K_{450} Mg_8 \text{ Pi}$ in einer Endkonzentration von 0,4 eq/ μl solubilisiert. Nach 3 min Zentrifugation bei 14.000 rpm in einer Mikrofuge wurde der Überstand auf einen 25 % - 50 % (w/v) Saccharosegradienten mit 2 % Digitonin oder 1 % DeoxyBigChap sowie $H_{50} K_{500} Mg_{10} \text{ Pi}$ gegeben und 1 Stunde bei 55.000 rpm (TLS55 Rotor) und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Gradient fraktioniert und die Fraktionen mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert.

3.2.5.4 Aufreinigung von Proteinen mit einem 6xHis-Motiv

Rekombinante Proteine, die ein 6xHis-Motiv tragen, können durch Affinitätsreinigung an Nickel-Nitrilo-tri-Essigsäure (NTA) isoliert werden (Janknecht *et al.*, 1991). NTA chelatiert 4 der 6 möglichen Bindungsstellen an einem Ni^{2+} Ion. An die freien Bindungsstellen der Ni^{2+} Ionen bindet das 6xHis-Motiv. Diese Bindung kann durch Absenken des pH-Wertes, oder Zugabe von Imidazol aufgehoben werden, wodurch das Protein von der NTA-Matrix eluiert. Die Konstruktion von rekombinanten Proteinen mit 6xHis-Motiv erfolgte mit Hilfe des Qiagen-Expressions-Kits. Als Expressionsplasmid wurde pQE-30 verwendet. Die Überexpression der Proteine im *E. coli* Stamm M15 [pREP4] sowie die Aufreinigung der exprimierten Proteine unter denaturierenden Bedingungen erfolgte nach Angaben des Herstellers (Qiagen). Die rekombinanten Proteine wurden zur Immunisierung von Kaninchen zwecks Antikörperproduktion verwendet. Auf diese Weise wurden Antikörper gegen das Hefeprotein Spc3p (rekombinantes Protein mit der Sequenz des luminalen Anteils von SPC3) und gegen das Säuger Sec63 (rekombinantes Protein mit der Sequenz von As 448 bis As 595 des Säuger Sec63) erzeugt.

3.2.5.5 Reinigung des ER-Signalpeptidase-Komplexes aus Hefe

Bei der Ausarbeitung des Reinigungsprotokolles wurde auf Arbeiten von Panzner *et al.* (1995) und Fang *et al.* (1996) zurückgegriffen. 80.000 bis 100.000 eq raue Mikrosomen aus dem *S. cerevisiae* Stamm DF5 wurden in 2,5 % (w/v) Digitonin, $H_{50} K_{400} Mg_{10} Gly_{10} DTT_2 \text{ Pi}$ (Digitoninhochsalzpuffer) in einer Konzentration von 1 eq/ μl extrahiert, wobei sich die Lipidschicht vollständig auflöst und integrale Membranproteine sowie luminal Proteine in Lösung gehen. Ribosomen, ribosomenassoziierte Proteine sowie Proteinaggregate wurden anschließend durch Zentrifugation (60 min, 60.000 rpm im Ti70 Rotor bei 4 °C) vom Überstand abgetrennt.

Der resultierende Überstand (Digitoninextrakt) wurde über Nacht bei 4 °C an 7 ml Concanavalin A-Sepharose (Pharmacia Biotech Inc.) gebunden. Die Bindung erfolgte ohne Zugabe von Ca^{2+} und Mn^{2+} Ionen, die normalerweise zugesetzt werden, um den tetrameren Con A Komplex zu stabilisieren. Durch den Verzicht auf diese zweiwertigen Kationen konnte eine im Digitoninextrakt vorhandene spezifische Protease-Aktivität stark reduziert werden, was zu einer höheren Ausbeute an SP-Komplex führte. Nach intensivem Waschen der Säule mit dem Niedrigsalzpuffer $H_{50} Dig_1 Gly_{10} DTT_2 \text{ Pi}$ erfolgte die Elution des SP-Komplexes von der Con A-Säule bei 25 °C mittels 1 M α -Methylmannosid in $H_{50} Dig_1 Gly_{10} DTT_2 \text{ Pi}$.

Die so gewonnene Glycoprotein-Fraktion wurde bei 4 °C an 5 ml HiTrap Q-Sepharose (Pharmacia Biotech Inc.) gebunden, wobei sich anschließend der SP-Komplex im Durchlauf der Säule befand. Um den Komplex weiter anzureichern, wurde der Durchfluß der Q-Säule an 1 ml SP-Sepharose (Pharmacia Biotech Inc.) gebunden und die SP-Sepharose Säule anschließend mit einem linearen Salzgradienten von 0 bis 500 mM KAc in H₅₀ Dig₁ Gly₁₀ DTT₂ Pi eluiert. Der SP-Komplex eluiert bei ca. 300 mM KAc von der SP-Sepharose Säule.

3.2.5.6 Coimmunopräzipitation von Sbh2p mit dem SP-Komplex

Hefe Mikrosomen aus Wildtypzellen und Δ spc2 Zellen wurden jeweils in 1,5 % (w/v) Digitonin, H₂₀ K₃₇₅ Mg₁₀ Gly₁₀ Pi in einer Konzentration von 0,5 eq/µl solubilisiert und anschließend Ribosomen, ribosomenassoziierte Proteine sowie ungelöste Bestandteile abzentrifugiert (1 h bei 4 °C und 70.000 rpm im TLA100.3 Rotor). Der resultierende Überstand wurde dann mit 4 Volumen H₂₀ Dig_{1,5} verdünnt und affinitätsgereinigte Antikörper gegen Spc1p oder Spc2p, die jeweils an Protein A-Sepharose gekoppelt waren, hinzugegeben. Nach 8 Stunden Inkubation bei 4 °C wurden die Protein A-Sepharose Beads 8 mal mit H₂₀ Dig_{1,5} K₁₀₀ Gly_{2,5} gewaschen und die gebundenen Proteine mit SDS-Probenpuffer eluiert.

3.2.5.7 Aufreinigung des Säuger Sec63/Sec61 Komplexes

Rinder PK-RM wurden in 2,5 % (w/v) Digitonin, H₅₀ K₅₀₀ Mg₁₀ Gly₁₀ β-Me₅ Pi in einer Konzentration von 0,75 eq/µl solubilisiert und anschließend unlösliche Bestandteile abzentrifugiert (1,5 h bei 4 °C und 70.000 rpm im Ti70 Rotor). Der resultierende Überstand wurde über eine HiTrap Q Säule (Pharmacia) gegeben und anschließend die Säule mit H₅₀ Dig_{0,5} K₅₀₀ Mg₁₀ Gly₁₀ β-Me₅ gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden stufenweise mit ansteigenden Salzkonzentrationen von 0,6 bis 1,2 M Kaliumacetat in H₅₀ Dig_{0,5} Mg₁₀ Gly₁₀ β-Me₅ Pi eluiert. Das Eluat bei 1,0 M Kaliumacetat wurde, mit zwei Volumen des Puffers H₅₀ Dig_{0,5} Mg₁₀ Gly₁₀ β-Me₅ Pi verdünnt und anschließend an eine anti-Sec61β Antikörpersäule gebunden. Nach Waschen der Säule mit Puffer H₅₀ Dig_{0,5} K₃₀₀ Mg₁₀ Gly₁₀ β-Me₅ Pi wurden die gebundenen Proteine bei 25 °C durch Zugabe des Peptides (1mg/ml), gegen das der Antikörper gerichtet war, eluiert.

3.2.5.8 Coimmunopräzipitation von Sec62 und Sec63 mit dem Sec61-Komplex

Rinder-RM wurden in einer Konzentration von 0,26 eq/µl in 1,5 % DeoxyBigChap, H₅₀ K₄₅₀ Mg_{12,5} Gly₁₀ β-Me₅ Pi solubilisiert. Unlösliches Material wurde anschließend durch eine Zentrifugation in der Eppendorfzentrifuge abgetrennt (3 min, 14.000 rpm bei 4 °C). Der Extrakt wurde dann für 20 min bei 75.000 rpm und 4 °C zentrifugiert (TLA 100.3-Rotor), wodurch Ribosomen und RAMPs pelletiert wurden. Der resultierende Überstand wurde mit einem Volumen 50 mM HEPES-KOH (pH 7,8) verdünnt und affinitätsgereinigte Antikörper gegen Sec61β oder Sec63, die jeweils an Protein A-Sepharose gekoppelt waren, hinzugegeben. Die Proben wurden für 10 Stunden bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert und anschließend die Beads mehrmals mit 0,7 % DeoxyBigChap, H₅₀ K₂₅₀ Mg_{7,5} Gly₁₀ β-Me₅ Pi gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden danach mit SDS-Probenpuffer eluiert. Aliquots aller Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunoblot analysiert.

4 Ergebnisse

4.1 Der ER-Signalpeptidase Komplex der Hefe

In Pro- sowie Eukaryonten werden Signalsequenzen von sekretorischen Proteinen durch spezifische Signalpeptidasen abgespalten. Man faßt diese Klasse von Peptidasen als Typ I Signalpeptidasen zusammen. Im Gegensatz zu den monomeren Signalpeptidasen der Prokaryonten bestehen die eukaryontischen ER-Signalpeptidasen aus heteromeren Proteinkomplexen.

Der Säuger SP-Komplex, gewonnen aus Hundepankreas, setzt sich aus 5 verschiedenen Membranproteinen zusammen (Evans *et al.*, 1986), im Vogel (Huhn) ist ein Komplex aus mindestens zwei Membranproteinen beschrieben (Baker und Lively, 1987). Auch die Signalpeptidase der Hefe *S. cerevisiae* besteht aus einem heteromeren Proteinkomplex, von dem zu Beginn der vorliegenden Arbeit zwei Proteine bekannt waren. Einerseits das Protein Sec11p, für das Böhni *et al.* (1988) zeigen konnten, daß es essentiell für die Spaltungsaktivität der ER-Signalpeptidase ist, und andererseits Spc1p, das mit Sec11p assoziiert ist und als Suppressor einer temperatursensitiven *SEC11*-Mutante gefunden wurde (Fang *et al.*, 1996). Dieser Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der biochemischen Aufreinigung des Signalpeptidase-Komplexes (SP-Komplex) aus der Hefe und der anschließenden molekularen und funktionalen Charakterisierung von neu gefundenen Untereinheiten.

4.1.1 Die Signalpeptidase der Hefe ist ein heteromerer Protein-Komplex

4.1.1.1 Aufreinigung der Signalpeptidase aus der Hefe *S. cerevisiae*

Die Aufreinigung der Signalpeptidase aus der Hefe *S. cerevisiae* erfolgte in einem mehrstufigen Reinigungsprozeß. Der Verbleib der Signalpeptidase in den einzelnen Aufreinigungsschritten konnte durch einen modifizierten Spaltungsassay nach YaDeau und Blobel (1989) verfolgt werden. Als Substrat wurde PräPro- α -Faktor benutzt, der *in vitro* in Gegenwart von [³⁵S]-L-Methionin synthetisiert wurde. Inkubierte man den PräPro- α -Faktor mit in Digitonin solubilisierten Mikrosomen, so wurde durch die enthaltene Signalpeptidase das Signalpeptid vom restlichen Protein abgespalten. Die prozessierte und nicht prozessierte Form des PräPro- α -Faktor konnten anschließend durch ihre unterschiedliche Größe im SDS-PAGE voneinander getrennt und mittels Autoradiographie sichtbar gemacht werden (Abb. 7, Bahn 1). Im weiteren Verlauf des Projektes war der Nachweis der Signalpeptidase auch durch Immunoblotting möglich, da Antikörper gegen die bekannten sowie neu gefundenen Untereinheiten des Hefe-SP-Komplexes erzeugt wurden.

Zum Zweck der Signalpeptidase-Aufreinigung wurden Hefemikrosomen in einem Hochsalz-Digitonin-Puffer solubilisiert, wobei sich die Lipidschicht vollständig auflöst und integrale Membranproteine sowie luminal Proteine in Lösung gehen (Panzner *et al.*, 1995). Ribosomen, ribosomenassoziierte Proteine sowie Proteinaggregate wurden danach durch Zentrifugation abgetrennt, wobei die Signalpeptidaseaktivität vollständig im Digitoninüberstand verblieb (Abb. 7, Bahn 3). Anschließend wurde der Überstand über Concanavalin A Sepharose gegeben, wobei α -D glycosylierte Proteine an die Concanavalin A Matrix banden. Nach intensivem Waschen der Säule wurden die gebundenen Proteine durch Zugabe von 1 M α -D Methylmannosid von der Concanavalin A Matrix eluiert. Die Signalpeptidase bindet an die Concanavalin A Sepharose (Abb. 7, Bahn 5), was vermuten läßt, daß mindestens eine der Untereinheiten des SP-Komplexes ein Glycoprotein ist. Anschließend wurde das Eluat an Q-Sepharose (Anionenaustauscher) chromatographiert, wobei die Signalpeptidase hauptsächlich im Durchlauf zu finden war (Abb. 7, Bahn 6). Danach erfolgte die Bindung des Q-Durchlaufs an SP-Sepharose (Kationenaustauscher), wobei die Signalpeptidase an die Säule band (Abb. 7, Bahn 9).

Eluierte man anschließend die Signalpeptidase mit einem linearen Salzgradienten wieder von der Kationenaustauscher-Säule, so fand man bei 300 bis 350 mM Kaliumacetat (Abb. 8 A, Fraktionen 13 bis 15) im *in vitro* Spaltungsassay die höchste Aktivität, sowie auch im Immunoblot die stärksten Signale der beiden SP-Untereinheiten Sec11p und Spc1p. Die Fraktion 14 wurde daraufhin gefällt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und Coomassie-gefärbt. Sechs Proteinbanden mit molaren Massen von etwa 29, 25, 20, 18, 19 und 12 kDa wurden sichtbar (Abb. 8 B).

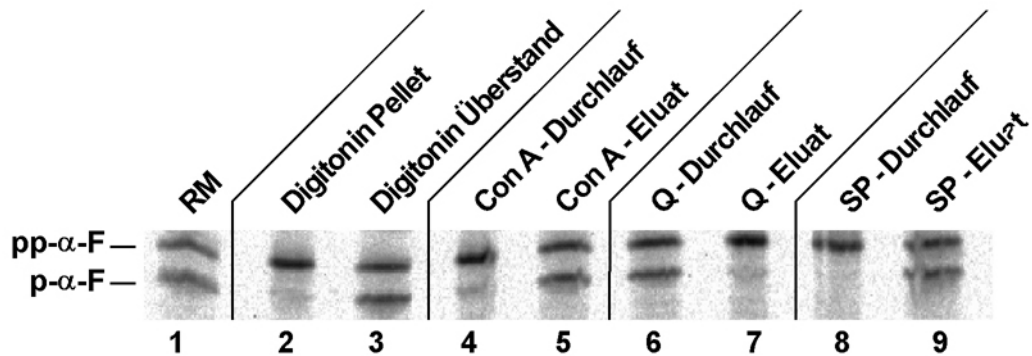


Abb. 7: **Aufreinigung des Hefe-SP-Komplexes (Teil 1).**

Nachweis der Signalpeptidase während der Aufreinigungsprozedur durch einen enzymatischen *in vitro* Spaltungsassay mit [35 S]-markiertem PräPro- α -Faktor als Substrat. Hefemikrosomen (Bahn 1) wurden in 2,5 % (w/v) Digitonin, H_{50} K_{400} Mg_{10} Gly_{10} DTT_2 Pi solubilisiert und anschließend die unlöslichen Bestandteile abgetrennt (Bahn 2: Pellet). Der resultierende Digitoninüberstand (Bahn 3) wurde über Nacht an Concanavalin A-Sepharose gebunden (Bahn 4: Durchlauf, Bahn 5: Elution). Das Eluat wurde dann über Q-Sepharose gegeben (Bahn 6: Stepelution mit H_{50} Dig_1 Gly_{10} Mg_{10} K_{1500} DTT_5 Pi , Bahn 7: Durchlauf) und anschließend der Durchlauf an SP-Sepharose gebunden (Bahn 6: Durchlauf, Bahn 7: Stepelution mit H_{50} Dig_1 Gly_{10} Mg_{10} K_{500} DTT_5 Pi). Von jeder Fraktion wurden 20 eq (Bahn 1 bis 4) bzw. 40 eq (Bahn 5 bis 7) entsprechend dem Ausgangsmaterial für den *in vitro* Spaltungsassay eingesetzt. Anschließend wurden die Proben mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Die obere Bande ist PräPro- α -Faktor (pp- α -F), die untere ist Pro- α -Faktor (p- α -F). Die Mikrosomen sowie das Digitonin- Pellet wurden für den Spaltungsassay jeweils zuvor in 2,5 % (w/v) Digitonin, H_{50} K_{400} Mg_{10} Gly_{10} DTT_2 Pi aufgenommen.

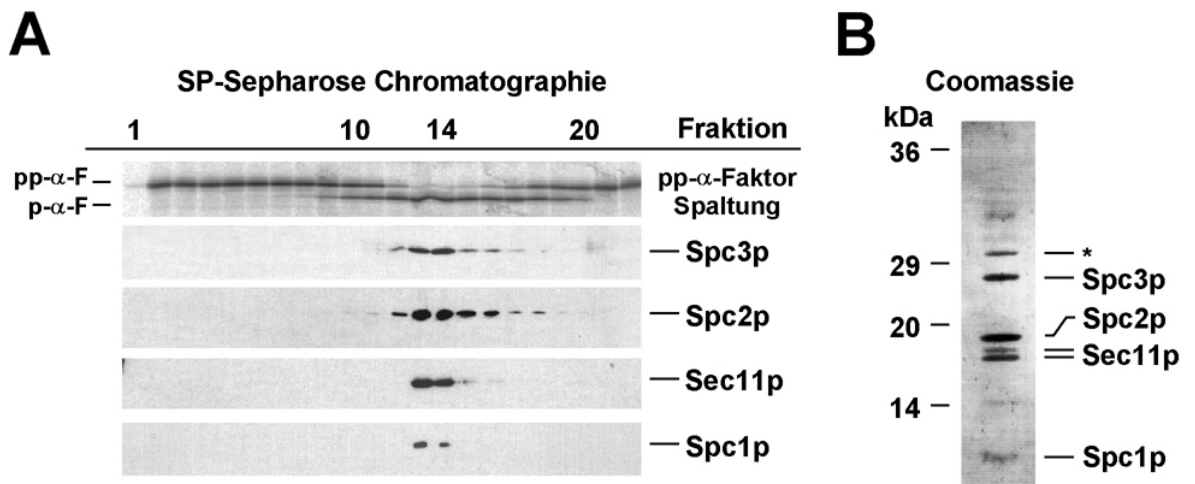


Abb. 8: **Aufreinigung des Hefe-SP-Komplexes (Teil 2).**

A) Letzter Schritt der SP-Komplex Aufreinigung: die Elution des Signalpeptidase-Komplexes von SP-Sepharose mit einem linearen Salzgradienten von 0 bis 500 mM Kaliumacetat. Die einzelnen Fraktionen wurden mit dem in Abb. 7 beschriebenen enzymatischen Spaltungsassay auf Signalpeptidaseaktivität untersucht, wobei von jeder Fraktion 300 eq entsprechend dem Ausgangsmaterial eingesetzt wurden. Zusätzlich erfolgte der Nachweis der Signalpeptidase mittels Immunoblotting mit Antikörpern gegen Sec11p und Spc1p. Desweiteren wurde mittels Immunoblotting auch das Elutionsverhalten der beiden neu gefundenen Proteine Spc2p und Spc3p (siehe B) analysiert.

B) Coomassiefärbung des angereicherten SP-Komplexes. Fraktion 14 der SP-Sepharose Elution (siehe B) wurde mit 40 % Polyethylenglycol gefällt und das Pellet mit Methanol und Aceton gewaschen. Die Probe wurde dann mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine Nitrocellulosemembran Coomassie Blau gefärbt. Die 6 deutlichsten Banden wurden durch Edman Abbau analysiert: Die SP-Untereinheiten Spc1p und Sec11p sowie drei weitere Proteine (Spc2p, Spc3p und „*“) konnten dabei identifiziert werden (siehe Text).

4.1.1.2 Identifizierung von Proteinen aus der aufgereinigten SP-Komplex-Fraktion

Aus den einzelnen Protein-Banden des aufgereinigten SP-Komplexes (Abb. 8 B) wurden N-terminale und/oder nach Spaltung interne Aminosäuresequenzen ermittelt. Die 29 kDa Bande (in Abb. 8 B mit „“ markierte Bande) wurde als Concanavalin A identifiziert, es handelte sich dabei wahrscheinlich um ein Reinigungsartefakt. Wie in Material und Methoden beschrieben, wurde auf die Zugabe von zusätzlichen zweiwertigen Kationen während der Concanavalin A-Bindung verzichtet, um eine Protease-Aktivität im Digitoninextrakt zu reduzieren. Ein Teil des Concanavalin A konnte sich dadurch anscheinend von der Säule lösen und lag so als Kontamination in späteren Fraktionen vor.

Die aus der 25 kDa Bande (in Abb. 8 B als „Spc3p“ bezeichnete Bande) ermittelte N-terminale Aminosäuresequenz konnte mit Hilfe der Yeast Proteome Database einem 184 As langen unbekannten Protein zugeordnet werden (Sequenz siehe in Abb. 9), was im weiteren Verlauf der Arbeit als Spc3p bezeichnet wurde.

Aus der 20 kDa großen Proteinbande (in Abb. 8 B als „Spc2p“ bezeichnete Bande) wurden nach Trypsinspaltung mehrere interne Aminosäuresequenzen ermittelt, die alle einem 178 As langen, bisher unbekannten Protein aus der Yeast Proteome Datenbank zuzuordnen waren (Sequenz siehe in Abb. 10). Das Protein wurde im weiteren Verlauf der Arbeit als Spc2p bezeichnet.

Die 18 kDa Bande sowie die etwas darüber laufende feine 19 kDa Bande konnten beide als Sec11p identifiziert werden. Die Doppelbande könnte darauf hinweisen, daß ein geringer Teil der Sec11p Population als Glycoprotein vorliegt. Bei der 12 kDa Bande handelte es sich um Spc1p. Die Aminosäuresequenzanalysen wurden freundlicherweise von Frau Dr. R. Kraft und Frau S. Kostka am Max-Delbrück-Centrum durchgeführt.

4.1.1.3 Molekulare Charakterisierung von Spc2p und Spc3p

Das Protein Spc3p ist 184 Aminosäuren groß und besitzt ein nahe am N-Terminus liegendes Transmembransegment. Im Mittelteil sowie kurz vor dem C-terminalen Ende von Spc3p befindet sich jeweils eine potentielle N-Glycosylierungsstelle. Von Herrn Dr. E. Hartmann durchgeführte Genbankvergleiche führten zur Identifizierung homologer Proteine in verschiedenen anderen eukaryontischen Organismen (Abb. 9).

Spc3p besitzt 26 % Identität zur Säuger SP-Untereinheit SPC22/23 (Evans *et al.*, 1986). Desweiteren gehört zur SPC22/23 Proteinfamilie auch das gp23, das von Baker und Lively (1987) im dimeren SP-Komplex aus Huhn gefunden wurde. Die Existenz von homologen SPC22/23-Sequenzen in *C. elegans*, *S. pombe* sowie *A. thaliana* (persönliche Mitteilung von Dr. E. Hartmann) sowie die hier gezeigte Coreinigung von Spc3p mit der Signalpeptidaseaktivität lassen vermuten, daß die Proteine der SPC22/23-Familie ein integraler Bestandteil aller eukaryontischen SP-Komplexe sind.

Anhand von Sequenzvergleichen konnte auch das Spc2p der Hefe einem Protein aus dem Säuger SP-Komplex zugeordnet werden. Spc2p ist zu 20 % identisch mit der Säuger-Untereinheit SPC25 (Abb. 10). In weiteren Genbankvergleichen wurden auch homologe Proteine zur SPC25 Untereinheit in *C. elegans*, *A. thaliana* und *S. pombe* gefunden. Alle diese Proteine besitzen jeweils zwei Transmembrandomänen, wobei für das SPC25 aus Hund gezeigt werden konnte, daß sich N- sowie C-Terminus im Cytoplasma befinden (Kalies und Hartmann, 1996). Der Abstand zwischen den beiden Membranankern ist sehr gering, wodurch der Hauptanteil des Proteins im Cytosol liegt. Die Säuger SP-Untereinheit SPC25 unterscheidet sich etwas vom Spc2p sowie den anderen gefundenen homologen Proteinen. Das Säugerprotein besitzt am N-Terminus einen glycinreichen Bereich, der in den anderen Proteinen fehlt.

```
CfSP22x23 --MNTVLSRANSLF--AFSLSVMAA---LTFGCFITTAFKDRSVPVRLHVSR--IMLNVEDFTGPREP  
GgSP22x23 --MNTVLSRANSLF--AFSLSVMAA---LTFGCFITTAFKERSVPVSIAVSR--VTLRNVEDFTGPREP  
CeSP22x23 --MHNLRSRANALL--AFTLVWMAA---VTAACFLSTVFLDYTVPTKLTVDN--VKVRNVVDYATDEQQ  
SpSP22x23 MIVDTFTNRGSTFFSK-----LSTVLFFLCAVITFGQVIQRREVELDTPVYVHYAKYRSARFYHAFRNV  
ScSpC3p M--FSFVQRFQNVSNQA1FSMGIVMVVFIMASSYYQLINNNASFPVSDNIDNVKTLINVRTSRYFGSQRGK  
* : * : : : : *
```

```
CfSP22x23 SDLGF-ITFDITADLENIFDWNVKQLFLYL2LSAEYSTKNNALNQVVWLWDKIVLRGDNPKLLLKDMKTKY-  
GgSP22x23 SDLAF-VTFDITADLQSIFDWNVKQLFLYL2LSAEYSTKNNALNQVVWLWDKIILRGDNPRFLDKDMKSKY-  
CeSP22x23 ADLAT-LNFNLKVDFS3KIFNWNVKQLFVYLVAEYKSKVNEVNQVVLWDRI4VERADRVMDEIGVKSKEY-  
SpSP22x23 RQQYAQVKFNMDADLSELWDWNTKHVVVYLVASYTEKEHNQVVVWDKILSSPEESKMFMKD5TLSNIQ  
ScSpC3p AKENMKIKFDLNTDLTPLFNWNTKQVFVYLTAEYNSTEKITSEVTFWDKIIKSDDAVIDVNDLRSKY-  
: :*:::*: :*:::*: **:*::: : :*: **:*: : : : :
```

```
CfSP22x23 -FFFDDGNGLKGNNRVTLT6LSWNVVPNAGILPLVTGSGHVSVPFPD7TYEITKSY  
GgSP22x23 -FFFDDGNGLKGNNRVTLT6LSWNVVPNAGLLPLVTGSGHMSVPFPD7TYETKSY  
CeSP22x23 -YFLDDGTNLLNHKNVFFVLRYNVIPNSGYRLRVQSSDQVVVPFPTTYTTTRS  
SpSP22x23 AHPFNEYSNQFEGKNATYTLHWTVSPKMGFLSWGAGPGSYEIPFHKIITQPK--  
ScSpC3p -SIWDIEDGGFEGLDVFLKLHWNVQPWVG8LTYGETVGN9YT-----TVENKNKV  
: : : : : * : * * * : : : :
```

4.1.1.4 Spc3p ist ein Glycoprotein

Alle bekannten Proteine der SPC22/23 Familie besitzen potentielle N-Glycosylierungsstellen. Für das SPC22/23 aus dem Säuger konnte gezeigt werden, daß es glycosyliert in der Zelle vorliegt (Evans *et al.*, 1986). Um zu untersuchen, ob auch Spc3p glycosyliert ist, wurde aufgereinigter SP-Komplex mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert, anschließend wurde dann die Nitrocellulose mit Concanavalin A konjugierter Peroxidase inkubiert.

Auf der Höhe von Spc3p wurde ein glycosyliertes Protein detektiert (Abb. 11, Bahn 1). Um das Ergebnis zu verifizieren, wurde in einem weiteren Experiment aufgereinigter SP-Komplex einer N-Glycosidase F-Behandlung unterzogen und mittels Immunoblotting analysiert (Abb. 11, Bahn 3). Verglichen mit unbehandeltem SP-Komplex (Abb. 11, Bahn 2) erkennt man, daß die Spc3p Bande nach N-Glycosidase F-Behandlung im SDS-PAGE von 25 kDa sich auf ca. 20 kDa verschiebt. Spc1p als Kontrolle hingegen läuft im SDS-Gel in Bahn 2 und 3 gleich. Der Shift von ca. 5 kDa deutet darauf hin, daß beide N-Glycosylierungsstellen glycosyliert waren. Die auftretende Doppelbande von Spc3p in Bahn 3 war wahrscheinlich das Resultat einer nicht vollständigen N-Glycosidase F- Spaltung.

Der Membrananker von Spc3p befindet sich in der Nähe des N-Terminus des Proteins, wogegen beide N-Glycosylierungsstellen hinter dem Membrananker auf der C-terminalen Seite liegen. Man kann also davon ausgehen, daß der kurze N-Terminus des Proteins im Cytoplasma liegt und der Hauptteil des Proteins sich im Lumen des ER befindet. Durchgeführte Proteaseschutzexperimente bestätigten diese Annahme (Daten nicht gezeigt).

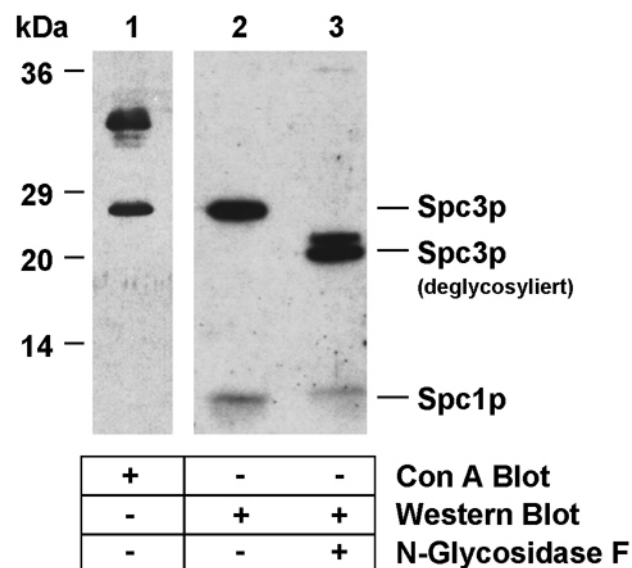


Abb. 11: **Spc3p ist ein Glycoprotein.**

Aufgereinigter SP-Komplex (entsprechend 500 eq Ausgangs-RM) wurde im SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose geblottet. Anschließend wurde die Nitrocellulose mit Concanavalin A konjugierter Peroxidase inkubiert (Bahn 1) Alternativ wurde SP-Komplex mit N-Glycosidase F inkubiert und anschließend mittels SDS-PAGE und Immunoblotting analysiert (Bahn 3). Bahn 2 zeigt unbehandelten SP-Komplex. Als Antikörper wurden anti-Spc3p und anti-Spc1p verwendet.

4.1.1.5 Spc2p und Spc3p sind integrale Bestandteile des SP-Komplexes der Hefe

Unabhängig von der säulenchromatographischen Aufreinigung der Signalpeptidase sollte auch durch Coimmunopräzipitationsexperimente gezeigt werden, daß der SP-Komplex mindestens aus den vier Untereinheiten Sec11p, Spc1p, Spc2p und Spc3p besteht.

Rauhe Mikrosomen aus Hefe wurde dafür in Hochsalzdigitoninpuffer solubilisiert und Ribosomen und Ribosomen assoziierte Proteine anschließend durch Zentrifugation abgetrennt. Der Digitoninextrakt wurde mit anti-Spc1p Antikörpern inkubiert und das resultierende Immunopräzipitat mittels SDS-PAGE und Immunoblotting analysiert (Abb. 12).

Es zeigte sich, daß unter den gewählten Bedingungen die anti-Spc1p Antikörper neben Spc1p und Sec11p auch den Großteil von Spc2p und Spc3p copräzipitierten. Sec62p als Kontrollprotein wurde dagegen nicht präzipitiert, es befand sich vollständig im Überstand. Coimmunopräzipitationen mit anti-Spc2p Antikörpern ergaben ein ähnliches Bild (Abb. 21).

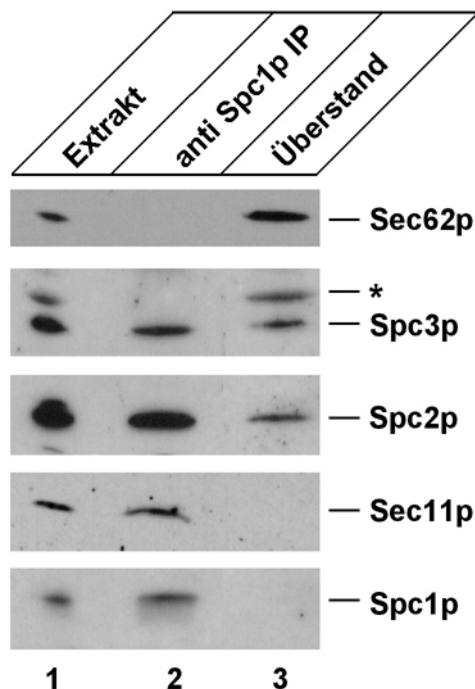


Abb. 12: Coimmunopräzipitation mit Anti Spc1p Antikörpern.

50 eq Hefemikrosomen wurden in 2,5 % Digitonin, H_{50} Gly_{10} Mg_{10} K_{400} Pi solubilisiert und anschließend die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation abgetrennt. Der resultierende Digitoninextrakt wurde auf H_{50} $Dig_{1.5}$ Gly_{10} Mg_2 K_{100} Pi eingestellt, 5 μ l affinitätsgereinigte Anti-Spc1p Antikörper hinzugegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Mittels Protein A Sepharose wurden die Antikörper eingesammelt, gewaschen und die gebundenen Proteine mit SDS-Probenpuffer eluiert. Die Proben wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Immunoblotting mit Antikörpern gegen die angegebenen Proteine analysiert. Ausgang (Bahn 1), Coimmunopräzipitat (Bahn 2), Überstand (Bahn 3). („*“ Kreuzreaktionsbande der anti-Spc3p Antikörper mit einem unbekannten Protein.)

4.1.2 Analyse der Funktion von Spc3p

4.1.2.1 Spc3p ist essentiell für das Zellwachstum

Um die Funktion des Spc3p Proteins in der Hefe *S. cerevisiae* näher zu charakterisieren, wurde eine Deletionsmutante von *SPC3* hergestellt. Die *SPC3*-Deletion wurde nach einer modifizierten Methode von Schneider *et al.* (1995) in den diploiden Stamm DF5 eingeführt. Der entstandene diploide Stamm mit einem deletierten *SPC3*-Locus wurde anschließend sporuliert und jeweils die separierten Sporen von ausgewählten Tetraden auf Vollmedium angezogen. Es zeigte sich, daß bei allen untersuchten Tetraden (10 Stück) nur maximal zwei der möglichen vier Sporen auskeimten. Mittels PCR konnte außerdem nachgewiesen werden, daß alle ausgekeimten Sporen das intakte Wildtyp *SPC3*-Allel enthielten (Daten nicht gezeigt). Spc3p scheint somit essentiell für das Überleben der Hefe zu sein.

4.1.2.2 Spc3p ist essentiell für die Prozessierung von Transportproteinen

Haploide Zellen mit deletiertem *SPC3* Locus wurden gerettet durch die Einführung eines Plasmides (pGal10Spc3), welches *SPC3* unter der Kontrolle eines Gal10 Promotors exprimiert. Der Gal10 Promotor wird durch Galaktose im Medium aktiviert und durch Glucose vollständig reprimiert (Johnston und Davis, 1984). Man besitzt somit die Möglichkeit, gezielt *SPC3* an- bzw. abzuschalten, wodurch weitere Studien bezüglich der Funktion von Spc3p in der Zelle möglich werden. Der gerettete $\Delta spc3$ Stamm (yHM1 mit pGal10Spc3) wurde über Nacht in galaktosehaltigem Minimalmedium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, gewaschen und in neues Medium überführt. Als Kohlenstoffquellen dienten dabei Glucose (Abb. 13 A, weiße Meßpunkte) oder ein Gemisch aus Galaktose und Saccharose (Abb. 13 A, schwarze Meßpunkte). Die im Galaktose-Medium enthaltene Saccharose hat dabei keine Einfluß auf die induzierende Wirkung der Galaktose (persönliche Mitteilung von Herrn Dr. T. Sommer). In mehreren unabhängigen Experimenten konnte gezeigt werden, daß jeweils nach 10 h die Wachstumsrate der Zellen in der Kultur mit Glucose-Medium stark abnahm und nach 18 h vollständig zum Erliegen kam.

Parallel zur Bestimmung der Wachstumskurven wurde in den $\Delta spc3$ Zellen die *in vivo* Prozessierung von Kar2p untersucht. Die Prä-Form des Kar2p besitzt eine N-terminale Signalsequenz, die nach dem Transport des Proteins ins Lumen des ER von der Signalpeptidase abgespalten wird. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Zellen aus der reprimierten Kultur geerntet und für 10 min *in vivo* mit [³⁵S] Methionin markiert. Nach der Markierung wurden die Zellen aufgeschlossen und PräKar2p sowie das prozessierte Kar2p mittels anti-Kar2p Antikörpern immunopräzipitiert. Die Immunopräzipitate wurden dann mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die markierten Proteine durch Autoradiographie (Abb. 13 B) und einem Phosphorimager analysiert. Es zeigte sich, daß nach 8 Stunden Repression von *SPC3* ca. 40 % des Kar2p Proteins als Präprotein vorlagen und nach 12 Stunden Repression sogar ca. 90 % nicht mehr prozessiert wurden. Der Verlust von Spc3p bewirkt also eine Präprotein-Akkumulation, was wahrscheinlich die Ursache für den beobachteten Zelltod ist.

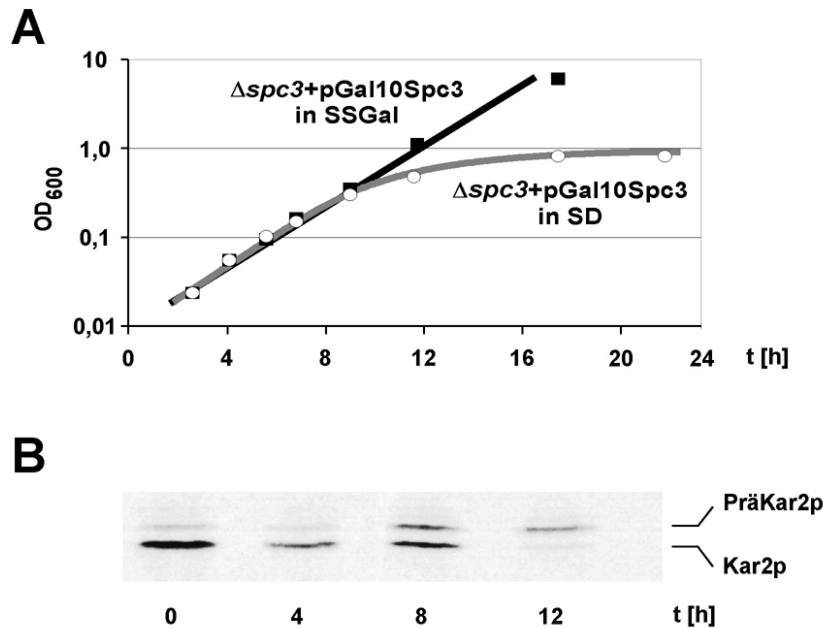


Abb. 13: *SPC3* ist essentiell für die Präprotein-Prozessierung des Kar2p.

A) Wachstumskurven des Stammes yHM1($\Delta spc3$) mit pGal10Spc3. Der Stamm wurde bei 30 °C in Minimalmedium mit 2 % Saccharose und 0,5 % Galaktose (SSGal) vorinkubiert (■ und schwarze Linie). Ein Teil der Zellen wurde dann in Minimalmedium mit 2 % Glucose (SD) umgesetzt (○ und graue Linie), was die Expression von *SPC3* reprimiert. Das Zellwachstum in den Kulturen wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm bestimmt.

B) Autoradiographie einer Anti-Kar2p Immunopräzipitation nach metabolischer Zellmarkierung. Zellen des Stammes yHM1($\Delta spc3$) mit pGal10Spc3 wurden nach Wechsel in SD Minimalmedium nach 0, 4, 8 oder 12 h geerntet und für 10 min mit [35 S] Methionin *in vivo* markiert. Anschließend wurden Zellextrakte präpariert und Kar2-Protein immunopräzipitiert. Die Präzipitate wurden mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. „PräKar2p“ ist die Präproteinform von Kar2p.

4.1.2.3 Der Verlust von Spc3p destabilisiert den SP-Komplex

Die oben gezeigte Akkumulation von Präproteinen kann unterschiedliche Ursachen haben. Neben dem Verlust der eigentlichen Signalpeptidaseaktivität gibt es auch die Möglichkeit, daß ein durch die Spc3p Depletion verursachter Translokationsdefekt vorliegt. Dabei würde das Präprotein im Cytosol akkumulieren und so nicht zugänglich für die ER-Signalpeptidase sein. Um die Möglichkeit eines solchen Transportdefektes auszuschließen, wurde die Spaltungsaktivität der Signalpeptidase *in vitro* im modifizierten Spaltungsassay nach YaDeau und Blobel (1989) untersucht. Zu diesem Zweck wurden wiederum Zellen des geretteten $\Delta spc3$ Stammes (yHM1 mit pGal10Spc3) zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Umsetzen in Glucosemedium geerntet. Aus den Zellen wurden Mikrosomen präpariert und mittels Immunoblotting auf gleiche Mengen Sec62p kalibriert. Sec62p ist eine essentielle Komponente des Sec-Komplexes (siehe Einleitung) und kann als Marker für die Menge an vorhandenem ER in der Membranpräparation herangezogen werden (siehe auch Ergebnisteil zu Spc2p). Anschließend wurde Digitoninextrakt aus den Mikrosomen hergestellt und *in vitro* die Aktivität der Signalpeptidase bestimmt (Abb. 14 A). Nach 9 Stunden Repression von *SPC3* begann die Signalpeptidaseaktivität abzunehmen. Sie betrug nach 15 Stunden nur noch ca. 1/6 des Ausgangswertes. Die Präkursor-Akkumulation ist also auf einen Defekt der Signalpeptidaseaktivität zurückzuführen, hervorgerufen durch den Verlust von Spc3p.

Neben der *in vitro* Spaltungsaktivität wurde auch untersucht, ob sich die Depletion von Spc3p auf die anderen Untereinheiten des Komplexes auswirkt. Die Zusammensetzung des SP-Komplexes während der Spc3p Depletion wurde durch SDS-PAGE und Immunoblotting ermittelt (Abb. 14 B). Es zeigte sich, daß nicht nur Spc3p herunter reguliert wurde, sondern parallel auch die Menge an Spc1p und Sec11p in der Membran stark abnahm und zwar bis unter die jeweilige Nachweisgrenze der Antikörper. Auch die Menge an Spc2p verringert sich während des Abschaltens von Spc3p, stabilisiert sich dann jedoch auf einem niedrigeren Niveau (Abb. 14 B, 9 bis 15 Stunden). Der Verlust von Spc3p hat also einen direkten Einfluß auf die Stabilität der restlichen Untereinheiten des SP-Komplexes und somit auch auf die Signalpeptidaseaktivität. Das auch nach 15 Stunden Repression von Spc3p noch eine geringe Spaltungsaktivität nachweisbar war, obwohl Sec11p als auch Spc3p im Immunoblot nicht mehr detektierbar waren, kann an einer Kontamination der Mikrosomen mit mitochondrialem Material gelegen haben. Die mitochondriale innere Membran Protease *IMP2* (Behrens *et al.*, 1991), die homolog zur *E. coli* Leaderpeptidase LepB ist, besitzt eine ähnliche Substratspezifität wie die ER-Signalpeptidase.

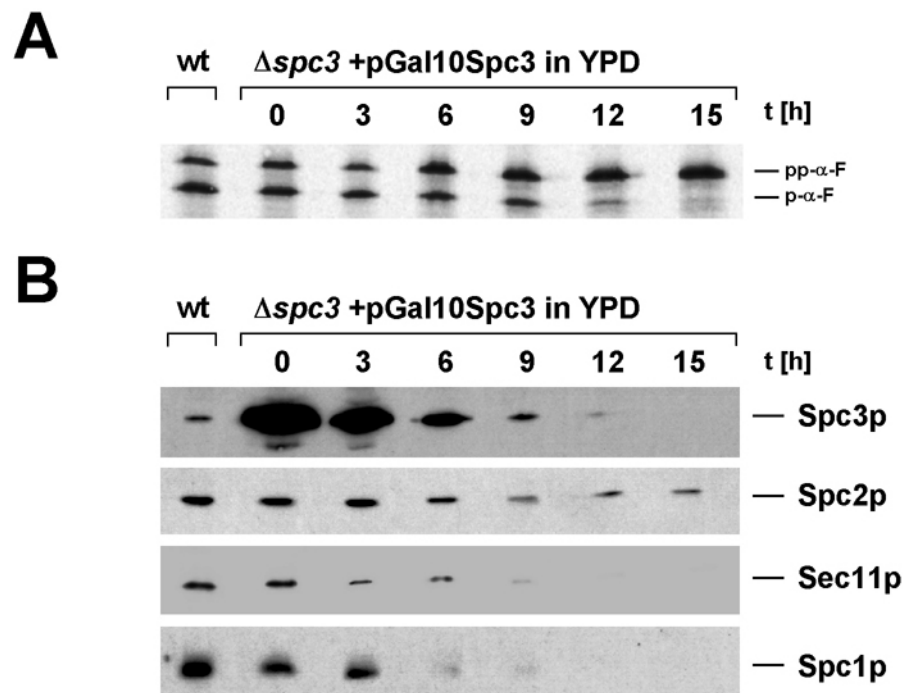


Abb. 14: **Auswirkung der Spc3p Depletion auf die *in vitro* Spaltungsaktivität und die Stabilität des SP-Komplexes.** Zellen des Stammes yHM1 ($\Delta spc3$) mit Plasmid pGal10Spc3 wurden vorinkubiert in YPGal und anschließend in YPD Medium überführt. Zu den Zeitpunkten 0, 3, 6, 9, 12 und 15 Stunden wurden jeweils ein Aliquot entnommen und RM präpariert. Die Wildtypmembranen (wt) wurden aus dem diploiden Hefestamm DF5 präpariert. Alle Membranen wurden durch quantitatives Immunoblotting auf gleiche Mengen Sec62p normalisiert. **A) Spaltungsassay mit [35 S]-markiertem PräPro- α -Faktor als Substrat.** Digitoninextrakt entsprechend 20 eq Wildtyp (wt) RM wurde jeweils eingesetzt, 3 Stunden bei 25 °C inkubiert, anschließend präzipitiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Phosphorimager analysiert. pp- α -F steht für PräPro- α -Faktor und p- α -F für die prozessierte Form Pro- α -Faktor. **B) Relative Menge an Untereinheiten des SP-Komplexes.** Immunoblot mit Antikörpern gegen Spc1p, Spc2p, Spc3p und Sec11p.

4.1.2.4 Sec11p kann die Funktion von Spc3p nicht ersetzen

Die SP-Untereinheit Sec11p ist ein essentielles Hefeprotein, das Sequenzhomologien zur Leader-peptidase der Prokaryonten aufweist (Böhni *et al.*, 1988; van Dijl *et al.*, 1992). Da der Verlust von Spc3p zur Destabilisierung und Abnahme des ganzen SP-Komplexes führte, konnte nicht ausgeschlossen werden, daß die auftretenden Effekte bei der Spc3p-Depletion ursächlich auf den parallelen Verlust von Sec11p zurückzuführen waren. Um diese Frage zu testen, wurde untersucht, ob eine Überexpression von Sec11p im $\Delta spc3$ Stamm yHM1 die Zellen retten kann. Dazu wurde ein Plasmid (pMet3Sec11), auf dem *SEC11* unter der Kontrolle eines Met3 Promotors expremiert wird, in den $\Delta spc3$ Stamm yHM1 transformiert. Der Stamm yHM1 enthielt außerdem das Plasmid pGal10Spc3, um Spc3p gezielt abschalten zu können. Zusätzlich wurde pMet3Sec11 als Kontrolle in den $\Delta sec11$ Stamm yHM2 transformiert, um sicherzustellen, daß das plasmidkodierte *SEC11* funktionell ist. Das Zellwachstum der Stämme wurde anschließend bei induziertem Met3-Promotor getestet, und zwar auf Minimalmedium-Platten mit Glucose oder Galaktose als Kohlenstoffquelle (Abb. 15 A). Es zeigte sich, daß Sec11p alleine die Depletion von *SPC3* auf Glucose Medium nicht komplementieren konnte, obwohl Sec11p beim Ausstreichen der yHM1 Zellen, die die Plasmide pGal10Spc3 und pMet3Sec11 enthielten, stark überexprimiert war (Abb. 15 B).

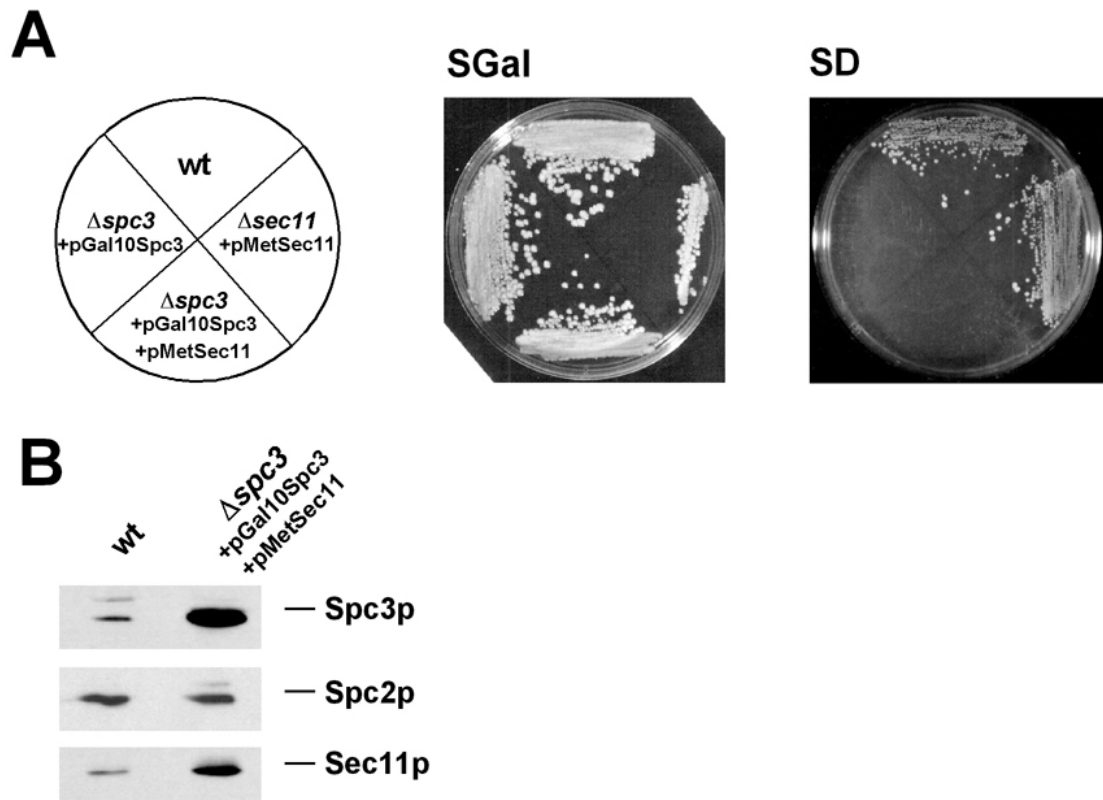


Abb. 15: Überexpression von Sec11p komplementiert nicht den Verlust von Spc3p.

A) Der Stamm yHM1 ($\Delta spc3$) wurde mit den Plasmiden pMet3Sec11 und pGal10Spc3 transformiert. Als Kontrollen wurden der Stamm yHM2 ($\Delta sec11$) mit pMet3Sec11, der Stamm yHM1 ($\Delta spc3$) mit pGal10Spc3 und der Wildtypstamm DF5 verwendet. Alle Stämme wurden über Nacht in Flüssig-Minimalmedium mit Galaktose angezogen und anschließend auf Minimalmedium Agar-Platten mit Glucose (SD) oder Galaktose (SGal) ausgestrichen und 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Das Schaubild links gibt die Position der Stämme auf den Platten an.

B) Zellen des Stammes yHM1 ($\Delta spc3$) mit pGal10Spc3 und pMet3Sec11 wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 in Minimalmedium mit Galaktose angezogen, dann Membranen präpariert und die Menge an Sec11p, Spc2p und Spc3p mittels Immunoblotting analysiert. Als Kontrolle dienten Wildtypmembranen aus dem Stamm DF5.

Aus dem Befund ergeben sich zwei Möglichkeiten. Entweder ist das überexprimierte Sec11p alleine nicht ausreichend, um die Spaltungsfunktion der Signalpeptidase auszuüben, oder aber die essentielle Funktion von Spc3p hat primär nichts mit der eigentlichen Signalprozessierung zu tun und kann dementsprechend auch nicht von Sec11p komplementiert werden. Bei der ersten Annahme, daß Sec11p weitere Untereinheiten des SP-Komplexes für die enzymatische Aktivität benötigt, handelt es sich wahrscheinlich um Spc3p, da Spc1p sowie Spc2p beide nicht essentiell für die Hefe sind (Fang *et al.*, 1996; Mullins *et al.*, 1996 und diese Arbeit) und der $\Delta Spc1/\Delta Spc2$ Stamm im *in vitro* Spaltungsassay immer noch Spaltungsaktivität zeigt (siehe Ergebnisteil zu Spc2p). Um zu überprüfen, ob Spc3p aktiv an der Signalsequenzspaltung beteiligt ist, wurde wiederum im $\Delta spc3$ Stamm, welcher gleichzeitig Sec11p überexprimiert, *SPC3* abgeschaltet und dann zu unterschiedlichen Zeitpunkten *in vitro* die Spaltungsaktivität ermittelt. Wenn Sec11p alleine für die Spaltung der Signalsequenz verantwortlich ist, sollte auch nach der Depletion von Spc3p noch die Spaltungsaktivität vorhanden sein.

Bei dem Experiment wurden Zellen des $\Delta spc3$ Stammes yHM1, welche die Plasmide pMet3Sec11 sowie pGal10Spc3 enthielten, in Flüssigkultur angezogen. Dabei wurde das Minimalmedium so gewählt, daß auf beide Plasmide selektioniert wurde und daß der Met3- und Gal10-Promotor induziert waren. Anschließend wurden die Zellen in glucosehaltiges Medium überführt, um den Gal10-Promoter vor dem *SPC3*-Gen auszuschalten. Der Met3-Promotor vor dem *SEC11*-Gen war weiterhin angeschaltet. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Mediumwechsel wurden Mikrosomen präpariert und auf gleiche Mengen Sec62p kalibriert. Anschließend wurde *in vitro* die Spaltungsaktivität ermittelt (Abb. 16 A) und mittels Immunoblotting die relativen Mengen der verschiedenen SP-Untereinheiten bestimmt (Abb. 16 B).

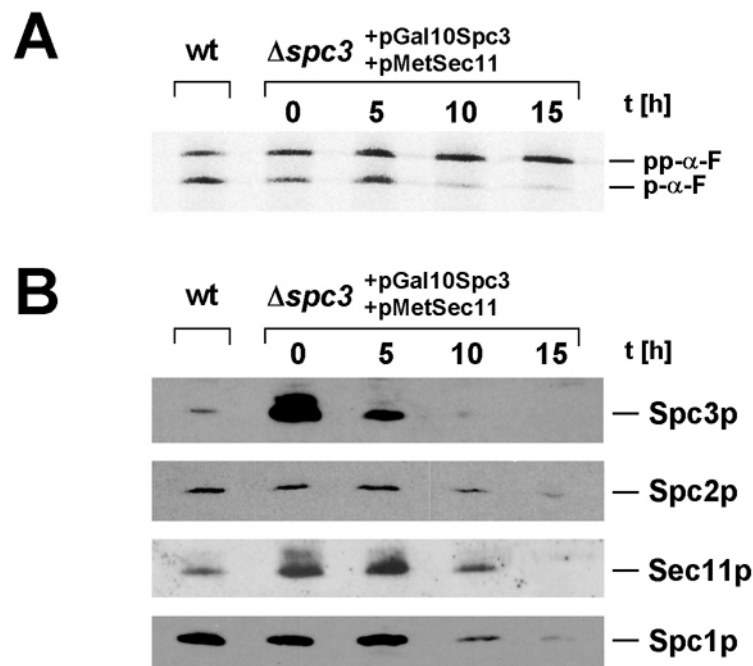


Abb. 16: **Überexpression von Sec11p verhindert nicht den Verlust der Signalpeptidaseaktivität *in vitro*.** Zellen des Stammes yHM1 ($\Delta spc3$) mit den Plasmiden pGal10Spc3 und pMet3Sec11 wurden in SSGal Minimalmedium (2 % Saccharose, 1 % Galaktose, -ura, -trp, -met) angezogen und anschließend in SD Minimalmedium (2 % Glucose, -ura, -trp, -met) überführt. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Wechsel (0, 5, 10 und 15 Stunden) wurden Zellen geerntet und entsprechend der in Abb. 14 beschriebenen Methode analysiert. Als Kontrolle wurden Wildtypmembranen (wt) aus dem diploiden Stamm DF5 isoliert. **A)** *in vitro* Spaltungsassay mit [35 S]-markiertem PräPro- α -Faktor (pp- α -F) als Substrat. Pro- α -Faktor (p- α -F) ist die prozessierte Form des PräPro- α -Faktors (pp- α -F). **B)** Relative Menge an Untereinheiten des SP-Komplexes. Immunoblot mit Antikörpern gegen Spc1p, Spc2p, Spc3p und Sec11p.

Es zeigte sich, daß wiederum parallel zum Verlust von Spc3p auch die Spaltungsaktivität der Signalpeptidase stark abnahm. Nach 10 Stunden Repression war Spc3p im Immunoblot nicht mehr detektierbar, Sec11p hingegen war zu diesem Zeitpunkt noch in vergleichbarer Menge wie in der Wildtyp Membran vorhanden (Abb. 16 B), zeigte dabei jedoch keine stimulierende Wirkung auf die Spaltungsaktivität (Abb. 16 A). Nach 15 Stunden Repression von *SPC3* waren auch Sec11p, Spc1p und Spc2p kaum noch im Westernblot detekierbar. Ursache ist wahrscheinlich, daß zu diesem Zeitpunkt die Zellen schon so extrem geschädigt waren, das eine reguläre Expression und/oder Insertion der Proteine in die Membran verhindert wurde.

Im Gegensatz zu den monomeren Leaderpeptidasen der Prokaryonten benötigt Sec11p anscheinend Spc3p, um katalytisch aktiv zu sein. Durch Komplementationsexperimente mit C- oder N-terminal verkürzten Spc3p Varianten konnte gezeigt werden, daß der gesamte N-terminale, cytosolisch gelegene Teil von Spc3p (14 Aminosäuren) nicht essentiell für die Funktion von Spc3p ist. Verkürzt man hingegen das luminal gelegene C-terminale Ende von Spc3p um 24 Aminosäuren, so führt dies zum Zelltod (Daten nicht gezeigt).

4.1.3 Analyse der Funktion von Spc2p

4.1.3.1 Spc2p ist unter normalen Wachstumsbedingungen nicht essentiell

Im Labor unseres Kooperationspartners Herrn Dr. N. Green von der Vanderbilt University konnte gezeigt werden, daß sowohl Spc1p als auch Spc2p nicht essentiell für das Überleben der Hefe sind. Die Einzeldelensionsstämme $\Delta spc1$ und $\Delta spc2$, sowie der Doppeldelensionsstamm $\Delta spc1/\Delta spc2$ zeigten bei Inkubationstemperaturen bis 38 °C keine Unterschiede zum Wildtypstamm. Inkubierte man jedoch den $\Delta spc2$ Stamm oder den $\Delta spc1/\Delta spc2$ Stamm bei 42 °C, wurde *in vivo* eine nicht lethale Akkumulation von sekretorischen Vorstufenproteinen beobachtet. Desweiteren konnte in der Arbeitsgruppe gezeigt werden, daß die Zellen der beiden Stämme nach längerer Inkubation bei 42 °C eine verminderte Überlebensfähigkeit im Vergleich zu gleichbehandelten Wildtypzellen aufwiesen. Die Kombination einer temperatursensitiven *SEC11* Mutante (*sec11-7*) mit einer *SPC2* Deletion erwies sich außerdem als synthetisch lethal (Fang *et al.*, 1995 und Mullins *et al.*, 1996).

4.1.3.2 Depletion von Spc2p destabilisiert den SP-Komplex und vermindert die Signalpeptidaseaktivität *in vitro*

Die Daten aus dem Labor von Herrn Dr. N. Green zeigten, daß unter Hitzeschock-Bedingungen (42 °C) der Verlust von Spc2p zur Präproteinakkumulation und verminderter Zellvitalität führte. Die in diesem Zusammenhang durchgeführten *in vivo* Spaltungsexperimente konnten jedoch nicht die Frage beantworten, ob die Präproteinakkumulation auf eine verminderte enzymatische Aktivität oder eine geringere Stabilität des Restkomplexes im $\Delta spc2$ Stamm zurückzuführen ist.

Um den Einfluß von Spc2p auf den restlichen SP-Komplex näher zu charakterisieren, wurden die von Herrn Dr. N. Green zur Verfügung gestellten Deletionsstämme HFY403 ($\Delta spc2$) sowie HFY401 ($\Delta spc1$) und HFY404 ($\Delta spc1/\Delta spc2$) unter normalen Aufzuchtbedingungen auf ihre Signalspaltungsaktivität *in vitro* und auf die Zusammensetzung des SP-Komplexes hin untersucht. Diese Untersuchungen erfolgten in enger Zusammenarbeit mit Herrn W. Antonin, sie wurden teilweise im Rahmen seiner Diplomarbeit durchgeführt und maßgeblich von mir betreut.

Um die Untereinheiten-Zusammensetzung des SP-Komplexes in den oben genannten Deletionsstämmen sowie einem entsprechenden Wildtypstamm zu ermitteln, wurden die Stämme bei 30 °C in Vollmedium angezogen und anschließend aus den Zellen Mikrosomen präpariert, die dann mittels Immunoblotting auf gleiche Mengen Sec62 kalibriert wurden. Die kalibrierten Membranen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Immunoblot mit Antikörpern gegen Sec11p, Spc1p, Spc2p und Spc3p analysiert. Durch die Verwendung von [³⁵S]-markierten sekundären Antikörpern sowie eines Phosphorimagers war es möglich, die jeweiligen Proteinmengen der Untereinheiten in Relation zum Wildtyp-Level semi-quantitativ zu bestimmen (Abb. 17).

Es zeigte sich, daß die Mengen an Sec11p und Spc3p im $\Delta spc2$ Stamm sowie auch im $\Delta spc1/\Delta spc2$ Stamm nur etwa der Hälfte des Wildtypniveau entsprachen. Im $\Delta spc1$ Stamm hingegen verblieben die restlichen Untereinheiten auf Wildtypniveau. Desweiteren war zu beobachten, daß in den Mikrosomen des $\Delta spc2$ Stammes Spc1p vollkommen fehlte, obwohl die Menge an *SPC1* mRNA weiterhin dem Wildtypniveau entsprach (Daten nicht gezeigt). Spc2p scheint somit einen großen Einfluß auf die Stabilität des SP-Komplexes zu besitzen. Die Menge der beiden essentiellen Untereinheiten Spc3p und Sec11p reduzierte sich auf die Hälfte. Die Depletion von Spc2p verhindert auch, das Spc1p stabil in der Membran verbleibt.

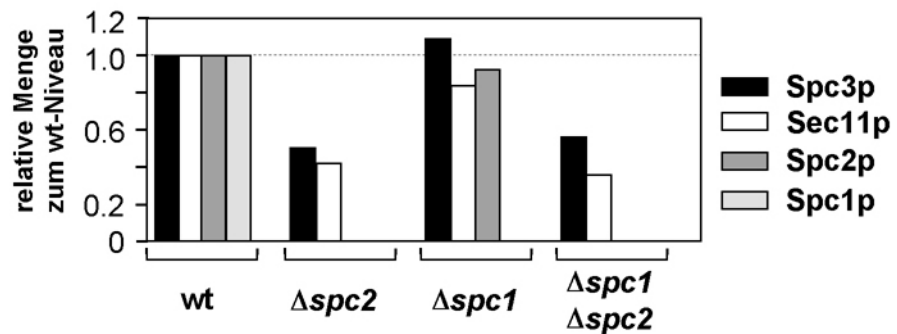


Abb. 17: **Expressionsniveau von SP-Untereinheiten in verschiedenen Deletionsstämmen.**

Mikrosomen aus den Stämmen DF5 (wt), HFY403 ($\Delta spc2$), HFY401 ($\Delta spc1$) und HFY404 ($\Delta spc1/\Delta spc2$) wurden mittels Immunoblotting auf gleiche Mengen Sec62p kalibriert. Anschließend wurden jeweils die Proteinmengen von Spc1p, Spc2p, Spc3p und Sec11p bestimmt und in Relation zum wt-Stamm DF5 gesetzt (1 entspricht wt-Niveau). Die Quantifikation der Proteinmengen erfolgte nach SDS-PAGE und Immunoblot mit Hilfe von [35 S] markierten sek. Antikörpern sowie einem Phosphorimager von Fuji. Die dargestellten Daten wurden der Diplomarbeit von Herrn W. Antonin entnommen.

Als nächstes wurde *in vitro* die Spaltungsaktivität der einzelnen Deletionsstämme untersucht (Abb. 18). Die verwendeten Mikrosomen wurden dafür auf gleiche Mengen der beiden essentiellen Untereinheiten Spc3p und Sec11p kalibriert, um die oben beschriebenen Mengenunterschiede an SP-Komplexen in den einzelnen Stämmen auszugleichen. Wir fanden, daß die Depletion von Spc1p keinen Einfluß auf die Spaltungsaktivität hatte, jedoch die Depletion von Spc2p zu einer Halbierung der Signalpeptidaseaktivität führte. Auch der $\Delta spc1/\Delta spc2$ Doppeldeletionsstamm zeigte eine Reduktion der Aktivität auf etwa die Hälfte.

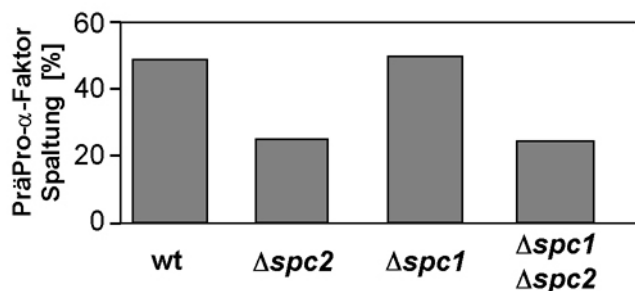


Abb. 18: ***In vitro* Spaltungsaktivität des $\Delta spc2$, $\Delta spc1$ und $\Delta spc2/\Delta spc1$ Stammes im Vergleich zum Wildtypstamm.** [35 S]-markierter PräPro- α -Faktor wurde als Substrat für den *in vitro* Spaltungsassay eingesetzt. Mikrosomen der Stämme Df5 (wt), HFY403 ($\Delta spc2$), HFY401 ($\Delta spc1$) und HFY404 ($\Delta spc1/\Delta spc2$) waren zuvor auf gleiche Mengen Spc3p und Sec11p kalibriert worden. Die Quantifizierung der Menge an prozessiertem α -Faktor erfolgte nach SDS-PAGE mittels eines Phosphorimagers (Fuji). Die dargestellten Daten wurden der Diplomarbeit von Herrn W. Antonin entnommen.

Im $\Delta spc2$ sowie im $\Delta spc1/\Delta spc2$ Stamm bestand der SP-Komplex nur noch aus Spc3p und Sec11p. Da für den *in vitro* Spaltungsassay die Mikrosomen zuvor in einem Detergenz solubilisiert wurden, konnte nicht ausgeschlossen werden, daß ein Teil des Rumpfkompleses dissoziiert oder denaturiert. Durch die Bindung von Digitoninextrakt aus solubilisierten Mikrosomen des $\Delta spc1/\Delta spc2$ Stammes an Concanavalin A Sepharose konnte jedoch gezeigt werden, daß nicht nur das glycosylierte Spc3p vollständig an die Matrix bindet, sondern auch Sec11p. Dieses ist nur möglich, wenn Sec11p noch vollständig mit Spc3p assoziiert ist (Daten nicht gezeigt).

Auch eine partielle Denaturierung des Komplexes erscheint unwahrscheinlich, da eine reduzierte Spaltungsaktivität auch beobachtet wurde, wenn anstelle von Digitonin eine Reihe anderer Detergenzien benutzte wurden, wie Triton X-100, DeoxyBigChap, Oktylglycosid oder auch Saponin (persönliche Mitteilung von W. Antonin). Saponin ist unter den gewählten Bedingungen ein sehr mildes Detergenz, das nicht in der Lage ist, die ER-Membran vollständig aufzulösen. Die integralen Membranproteine verbleiben nativ in der perforierten Membran (Panzner *et al.*, 1995).

Um ausschließen zu können, daß die bisher beschriebenen Effekte des untersuchten $\Delta spc2$ Stammes nicht auf sekundären genetischen Defekten der Ursprungssporen beruhten, wurde der Stamm HFY403 mit einem plasmidkodierten *SPC2* Gen komplementiert, das unter der Kontrolle eines Gal10 Promotors stand (pGal10Spc2). Somit war es möglich, Spc2p gezielt an- bzw. abzuschalten und beide Zustände miteinander zu vergleichen. Zellen des komplementierten Deletionsstammes wurden dafür in Flüssigmedium mit Galaktose angezogen und anschließend für 10 Stunden in Medium mit Glucose inkubiert, wodurch *SPC2* reprimiert wurde. Danach wurden die Zellen wiederum für 6 Stunden in Medium mit Galaktose inkubiert, was die Expression von Spc2p wieder induzierte. Zu verschiedenen Zeitpunkten des Experiments wurden aus den Zellen Mikrosomen präpariert und mittels Immunoblotting auf gleiche Mengen Sec62p kalibriert.

Der induzierte $\Delta spc2$ Stamm (mit pGal10Spc2) zeigte im *in vitro* Spaltungsassay keinen Unterschied zum isogenen Wildtypstamm (Abb. 17 A, 0 Stunden). Durch den verwendeten Gal10 Promotor war Spc2p zu diesem Zeitpunkt stark überexprimiert, die Mengen an Spc1p und Spc3p entsprachen jedoch dem Wildtypniveau. Die Menge von Sec11p konnte leider nicht bestimmt werden, da zum Zeitpunkt der Experimente keine funktionsfähigen anti-Sec11p Antikörper mehr zur Verfügung standen. Bei der anschließenden Repremierung von Spc2p zeigte sich, daß zeitlich versetzt auch die Mengen von Spc1p sowie Spc3p abnahmen. Nach 8 Stunden Repression von Spc2p war in der Membran neben Spc2p auch kein Spc1p mehr nachweisbar, die Menge an Spc3p hatte sich auf die Hälfte des Wildtyplevels reduziert und veränderte sich auch nach 10 Stunden Repression von Spc2p nicht mehr. Die ermittelte *in vitro* Signalpeptidaseaktivität betrug zu diesen Zeitpunkten nur noch ca. ein Viertel der Ausgangsaktivität (Abb. 19 A, Mittelwert aus Zeitwert 8 h und 10 h). Der Unterschied um Faktor 2 zur oben beschriebenen Aktivitätsabnahme im $\Delta spc2$ Stamm ohne Komplementation beruhte darauf, daß die Mikrosomen in den beiden Experimenten auf unterschiedliche Proteine kalibriert waren. Im Abschaltexperiment wurde auf gleiche Mengen Sec62p kalibriert, wodurch sich zwei Effekte summieren: erstens die Reduzierung der Menge des Rumpf-SP-Kompleses (Sec11p und Spc3p) auf die Hälfte des Wildtypniveaus und der Umstand, daß der Rumpfkomplex nur noch die halbe Spaltungsaktivität des Wildtyp-Kompleses besitzt. Bei der vorherigen Untersuchung des $\Delta spc2$ Stammes ohne Komplementationsexperiment war auf gleiche Mengen an Rumpfkomplex kalibriert, wodurch nur die verminderte Aktivität des Rumpfkomplexes gemessen wurde.

Die Deletion von *SPC2* führte dazu, daß Spc1p nicht mehr in den SP-Komplex integriert werden konnte. Ist nun der Verlust von Spc2p alleine oder erst die Kombination mit Spc1p für die beobachtete Abnahme an Spaltungsaktivität im $\Delta spc2$ Stamm verantwortlich? Das Abschaltexperiment zeigte deutlich, daß erst der Verlust beider Untereinheiten zum Aktivitätsverlust führt. Nach vier Stunden Repression im Glucosemedium betrug die Expression von Spc2p nur noch ca. 10 % des Wildtyps, die Menge an Spc1p hingegen war noch nicht reduziert und die *in vitro* Spaltungsaktivität entsprach dem Wildtypniveau. Erst mit der Abnahme von Spc1p (und Spc3p) nahm auch die Spaltungsaktivität ab (Abb. 19, Zeitwert 6 bis 10 Stunden). Spc2p war zu diesen Zeitpunkten im Immunoblot schon nicht mehr nachweisbar. Da der Verlust von Spc1p alleine keine Auswirkungen auf die *in vitro* Spaltungsaktivität hat (siehe Abb. 18: $\Delta spc1$ Stamm), mußten beide Proteine gemeinsam für die beobachtete Reduzierung der *in vitro* Spaltungsaktivität im $\Delta spc2$ Stamm verantwortlich sein.

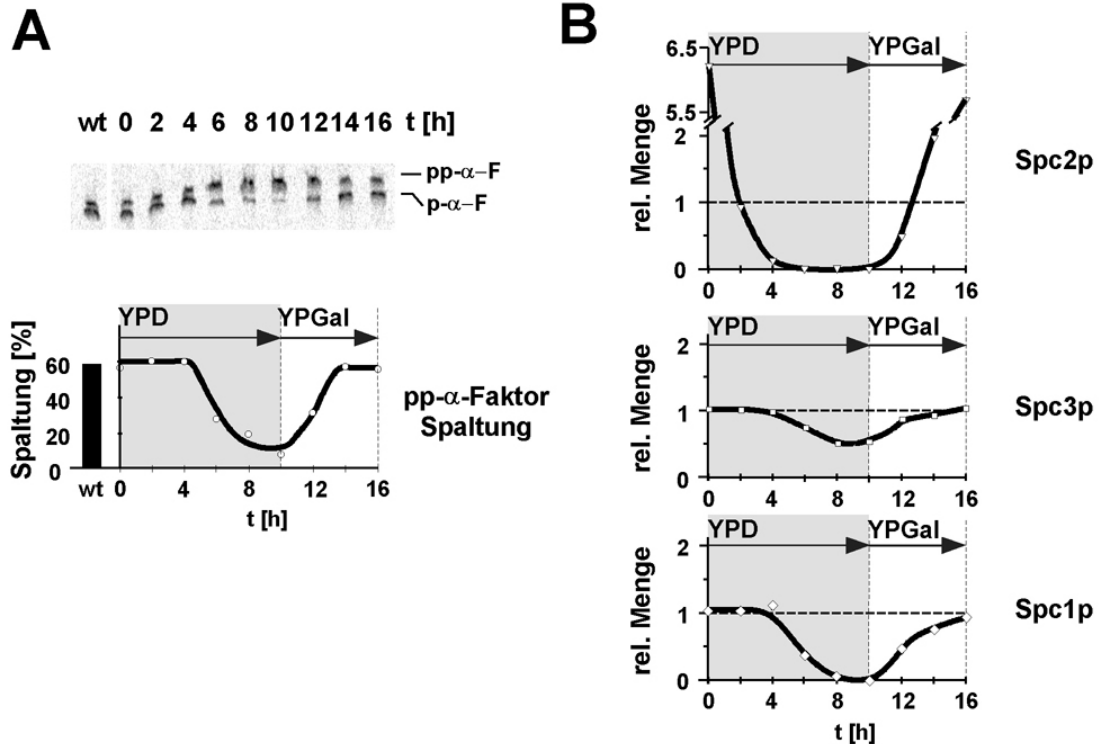


Abb. 19: **Abschaltexperiment Spc2p.**

Zellen des $\Delta spc2$ Stammes HFY403 mit dem Plasmid pGal10Spc2 wurden in Galaktose-Vollmedium (YPGal) bei 30 °C inkubiert (Zeitwert: 0 h). Anschließend wurden die Zellen für 10 Stunden in Glucose-Vollmedium (YPD) bei 30 °C inkubiert (Repression von Spc2p), um danach für 6 Stunden in Galaktose-Vollmedium (YPGal) inkubiert zu werden (Induktion von Spc2p). Während des Experimentes wurden jeweils in Abständen von 2 Stunden Aliquots entnommen und Mikrosomen präpariert. Diese, sowie Mikrosomen aus dem wt-Stamm SEY62.10 wurden mittels Immunoblotting auf gleiche Mengen Sec62p kalibriert.

A) *in vitro* Spaltungsassay mit [35 S]-markierten PräPro- α -Faktor als Substrat. Mikrosomen entsprechend 40 eq wurden eingesetzt. Die Quantifizierung der Menge an prozessiertem α -Faktor erfolgte nach SDS-PAGE mit einem Phosphorimager. Im oberen Teil der Abbildung ist die entsprechende Autoradiographie des SDS-Gels dargestellt.

B) Bestimmung der Mengen von Spc1p, Spc2p und Spc3p relativ zum Wildtyp. Die Quantifizierung der Proteinmengen nach SDS-PAGE und Immunoblot erfolgte mit Hilfe von [35 S]-markierten sek. Antikörpern sowie einem Phosphorimager. Der Wert 1 entspricht wt-Niveau.

4.1.3.3 Die Depletion von Spc2p verringert die Menge an Sbh2p in der Zelle

Im oben durchgeführten Abschaltexperiment wurden die Expressionsniveaus der einzelnen Unter-einheiten des SP-Komplexes im zeitlichen Verlauf analysiert. Die präparierten Mikrosomen wurden hierfür auf jeweils gleiche Mengen Sec62p kalibriert. Während des Depletions-Experimentes konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß sich die Menge an Sec62p vielleicht doch in Abhängigkeit von Spc2p verändert und somit Sec62p nicht als Standard benutzt werden kann. Als Kontrolle wurden daher die Expressionsniveaus von weiteren Proteinen des Translokationsapparates mittels Immunoblotting ermittelt (siehe Abb. 20).

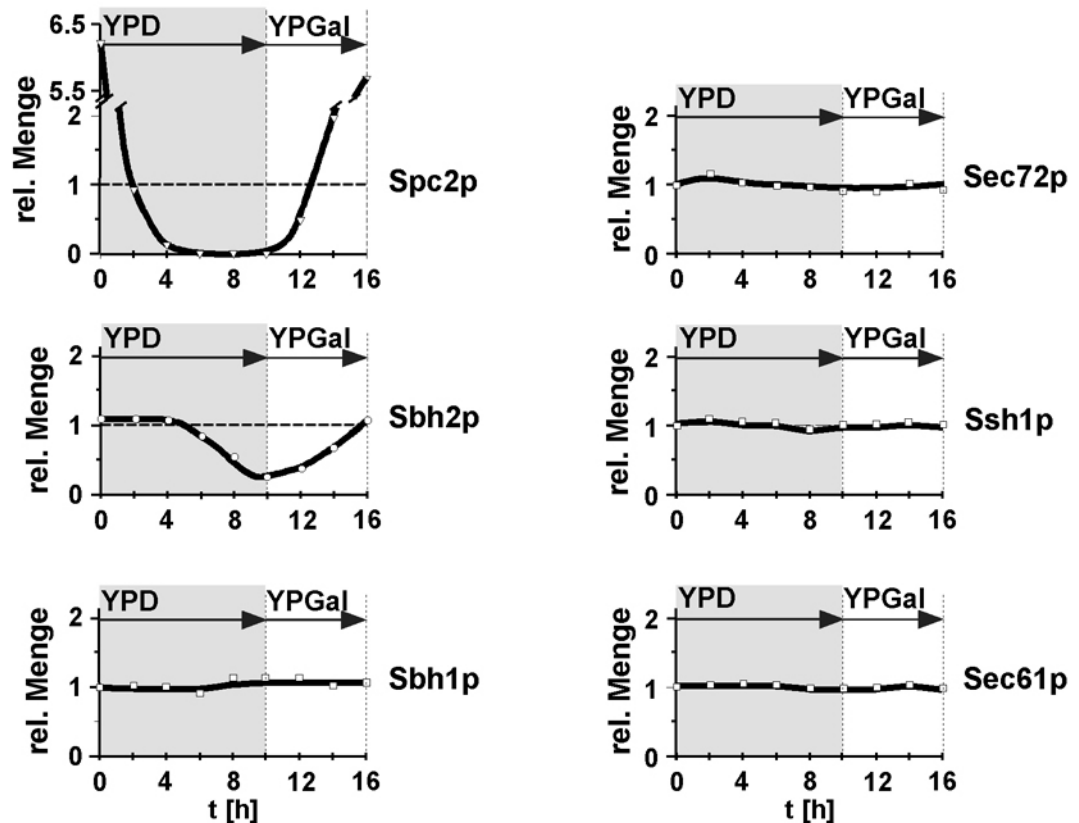


Abb. 20: **Die Depletion von Spc2p verändert die Menge an Sbh2p in der Zelle.**

Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden während des Abschaltexperimentes (siehe Abb. 19) Mikrosomen präpariert und mittels Immunoblotting auf gleiche Mengen Sec62p kalibriert. Anschließend wurden die Expressionsniveaus von Spc2p, Sbh2p, Sec72p, Sbh1p, Sec61p und Ssh1p mittels SDS-PAGE und Immunoblotting bestimmt und in Relation zum wt-Stamm SEY62.10 gesetzt (1 entspricht wt-Niveau). Die Quantifizierung der Proteinmengen im Immunoblot erfolgte mit Hilfe von [³⁵S]-markierten sek. Antikörpern sowie einem Phosphorimager von Fuji (Sec62p, Spc2p, Sbh2p, Sec61p und Ssh1p) oder mittels Peroxidase gekoppelten sek. Antikörpern, dem ECL-System und einem Lumineszenzvideosystem von Raytest (Sbh1p und Sec72p).

Getestet wurden die Expressionsniveaus von Sec61p, Sec72p, Ssh1p, Sbh1p, sowie Sbh2p (Zuordnung der einzelnen Proteine zu den verschiedenen Translokationssubkomplexen der Hefe siehe Faltblatt im Anhang: Abb. 35). Wie aus der Abbildung zu entnehmen ist, blieben die Proteinmengen von Sec72p, Sec61p, Sbh1p und Ssh1 (der α -Untereinheit des Ssh1-Komplexes) während der Depletion von Spc2p konstant. Alle diese Proteine verhielten sich dementsprechend wie Sec62p. Überraschenderweise zeigte jedoch Sbh2p, die β -Untereinheit des Ssh1-Komplexes, ein anderes Verhalten. Während der Repression von Spc2p nahm die Menge an Sbh2p in der Membran zeitversetzt mit ab, und zwar um bis zu 80 % der ursprünglichen Wildtypmenge. Bei der anschließenden Reinitiation der Spc2p Synthese stieg die Menge an Sbh2p in der Membran wieder auf das anfängliche Wildtypniveau zurück. Der gleiche Effekt, daß Spc2p die Menge an Sbh2p in der Membran beeinflusst, konnte auch im reinem $\Delta spc2$ Stamm sowie im $\Delta spc1/\Delta spc2$ Stamm beobachtet werden. In beiden Fällen ist die Menge an Sbh2p, verglichen mit der Sbh2p Menge eines entsprechenden isogenen Wildtypstammes, in gleicher Größenordnung wie im Abschaltexperiment reduziert. Im $\Delta spc1$ Stamm hingegen konnte keine Abnahme von Sbh2p beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

4.1.3.4 Der SP-Komplex interagiert physisch mit Sbh1p und Sbh2p

Die Menge an Spc2p in der Membran scheint einen direkten Einfluß auf die Menge an Sbh2p zu haben. Finke *et al.* (1996) konnten zeigen, daß Sbh2p *in vivo* instabil wird, wenn es nicht mit einer α -Untereinheit wie Ssh1p oder Sec61p assoziiert ist. Da beim Verlust von Spc2p eine Abnahme von Sbh2p zu beobachten ist, kann man vermuten, daß auch der SP-Komplex über die Spc2p-Untereinheit physisch mit Sbh2p interagiert. Um eine solche physische Interaktion zwischen der Signalpeptidase und Sbh2p in der Hefe nachzuweisen, wurden Coimmunopräzipitations-Experimente durchgeführt.

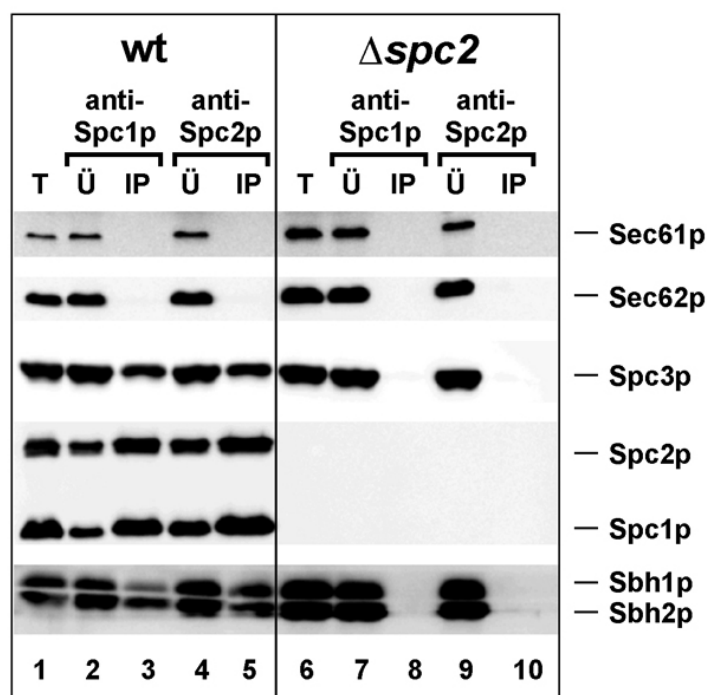


Abb. 21: **Coimmunopräzipitation von Sbh1p und Sbh2p mit Antikörpern gegen Spc1p und Spc2p.** Aus Mikrosomen des wt-Stammes (Sey62.10) sowie des $\Delta spc2$ Stammes (HFY403) wurden Digitoninextrakte präpariert. Zu den Digitoninextrakten wurden an Protein A-Sepharose gekoppelte Antikörper gegen Spc1p oder Spc2p hinzugeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden anschließend mit SDS-Probenpuffer eluiert. Proben des Ausgangs (T=Total), der Coimmunopräzipitate (IP) sowie der Überstände (Ü) wurden im SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Immunoblotting mit Antikörpern gegen die angegebene Proteine analysiert.

Aus Zellen des $\Delta spc2$ Stammes bzw. des entsprechenden Wildtypstammes wurden jeweils Mikrosomen präpariert und in einem Hochsalz-Digitonin-Puffer solubilisiert. Anschließend wurden durch Zentrifugation Ribosomen sowie ribosomenassoziierte Proteine pelletiert. Zum resultierenden Überstand wurden Antikörper gegen Spc1p oder Spc2p, die jeweils an Protein A-Sepharose gekoppelt waren, hinzugegeben und für 8 Stunden bei 4 °C inkubiert. Nach intensivem Waschen der Beads wurden die gebundenen Proteine durch SDS-Probenpuffer eluiert und mittels SDS-PAGE und Immunoblotting analysiert. Wie aus Abb. 21 zu entnehmen ist, konnten in den Wildtyp-Membranen sowohl mit anti-Spc1p als auch mit anti-Spc2p Antikörpern jeweils die anderen Untereinheiten des SP-Komplexes coimmunopräzipitiert werden, sowie zusätzlich auch eine geringe Menge (ca. 5 bis 10 % der Gesamtmenge) an Sbh2p und Sbh1p (Abb. 21, Bahn 3 und Bahn 5). Anzumerken bleibt dabei, daß zwar die β -Untereinheit des Sec61-Komplexes coimmunopräzipitiert wurde, jedoch nicht die α -Untereinheit, obwohl unter den verwendeten Pufferbedingungen der trimere Sec61-Komplex stabil war (Daten nicht gezeigt). Daß die gebundene Proteine Sbh2p und Sbh1p spezifisch mit dem SP-Komplex assoziiert sind, zeigt die Kontrolle mit Material aus dem $\Delta spc2$ Stamm. Wäre die Interaktion von Sbh2p und Sbh1p auf eine unspezifische Bindung an die Antikörper zurückzuführen, so müßten auch im $\Delta spc2$ Stamm die beiden Proteine im Immunopräzipitat zu finden sein, was jedoch nicht der Fall war.

4.2 Identifizierung einer Sec-Komplex ähnlichen Struktur im Säuger

Beim Transport von Proteinen durch die Membran des ER sind mindestens 20 verschiedene Polypeptide direkt oder indirekt beteiligt (Kalies und Hartmann, 1998). In allen bisher untersuchten Eukaryonten bildet dabei der Sec61-Komplex die zentrale Pore für den Translokationsprozeß. In Säugerzellen erfolgt der Proteintransport durch die ER-Membran fast ausschließlich cotranslational. Kleine sekretorische Proteine werden jedoch auch im Säugersystem ribosomenunabhängig ins ER transportiert (Zimmermann *et al.*, 1990; Klappa *et al.*, 1991). Im Gegensatz zum molekular und mechanistisch gut untersuchten posttranslationalen Transport in der Hefe *S. cerevisiae* ist es beim Säuger bisher ungeklärt, welche Komponenten für diesen Transportmodus benötigt werden.

In diesem Teil der Arbeit wurde die molekulare Umgebung von nicht Ribosomen assoziierten Sec61-Komplexen aus Säugerzellen untersucht, mit dem Ziel, mögliche Komponenten eines posttranslationalen Transportkomplexes zu identifizieren.

4.2.1 Identifizierung und Klonierung von Sec62p und Sec63p homologen Proteinen im Säuger

Ausgangspunkt war die Fragestellung, ob in Abwesenheit von Ribosomen noch Proteine mit dem trimeren Sec61-Komplex im Säuger assoziiert sind. Um dies zu untersuchen, wurden raue Mikrosomen aus Rinderpankreas durch eine Hochsalz-Puromycin-Behandlung von Ribosomen befreit und die resultierenden PK-RM in einem Hochsalz Digitoninpuffer solubilisiert. Anschließend wurden nicht gelöste Aggregate durch Zentrifugation abgetrennt und der resultierende Überstand an eine anti-Sec61 β Antikörpersäule gebunden. Nach intensivem Waschen der Säule wurden die gebundenen Proteine durch Zugabe großer Mengen des Peptides, gegen das die anti-Sec61 β Antikörper der Säule gerichtet waren, wieder eluiert. Die im Eluat enthaltenen Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassiefärbung sichtbar gemacht (Abb. 22, Bahn 4). Die Coomassiefärbung des Eluats zeigte, daß außer dem Sec61-Komplex (im Gel repräsentiert durch Sec61 α und Sec61 β) noch zwei weitere Proteinbanden mit molaren Massen von ca. 80 kDa und ca. 97 kDa vorhanden waren.

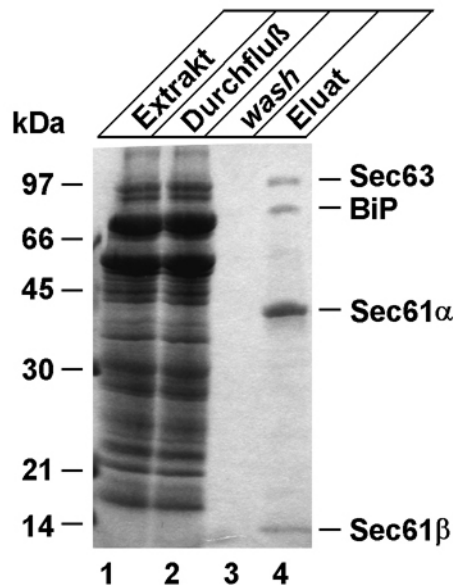


Abb. 22: Identifizierung von Sec63p im Säuger.

Rinder PK-RM wurden mit 2,5 % Digitonin in H_{50} K_{500} Mg_{10} Gly_{10} β - Me_5 Pi solubilisiert und anschließend die nicht gelösten Bestandteile durch Zentrifugation abgetrennt. Der resultierende Extrakt wurde an eine anti-Sec61 β -Antikörpersäule gebunden. Nach intensivem Waschen der Säule mit 0,5 % Digitonin in H_{50} K_{250} Mg_{10} Gly_{10} β - Me_5 Pi (*wash*) wurde das gebundene Material durch Zugabe großer Mengen des Peptides, gegen das die Antikörper gerichtet waren, von der Säule eluiert (Eluat). Proben entsprechend 20 eq (Extrakt und Durchlauf) oder 450 eq (*wash* und Eluat) des Ausgangsmaterials wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend Coomassie gefärbt. Aus den Proteinbanden des Eluats wurden nach Spaltung mit Trypsin und anschließendem Edman-Abbau interne Aminosäuresequenzen ermittelt. Aus der 80 kDa Bande (BiP) ergaben sich die Peptide TKPYIQVDVG und AVEEKI, welche beide dem Protein BiP zuzuordnen waren. Die ermittelten Peptidsequenzen aus der 97 kDa Bande (Sec63) sind in Abb. 23 dargestellt.

Aus den Proteinbanden wurden nach Trypsinspaltung durch Edman-Abbau interne Aminosäuresequenzen ermittelt. Die 80 kDa Proteinbande konnte als das zur Hsp70 Familie gehörende luminal vorkommende BiP identifiziert werden. Die aus der 97 kDa Bande ermittelten Peptidsequenzen (siehe in Abb. 23 die mit „o“ markierten Bereiche) korrespondierten mit einer Gruppe von menschlichen „expressed sequence tags“ aus der „GenBank“ Datenbank (persönliche Mitteilung von Dr. E. Hartmann). Ausgehend von diesem Sequenzmaterial war es im Labor von Herrn Dr. S. Prehn möglich, eine cDNA zu klonieren und zu sequenzieren, dessen Proteinsequenz alle ermittelten Peptidsequenzen aus der 97 kDa Bande enthielt. Sequenzvergleiche ergaben, daß das neu gefundene Säugerprotein Homologien zum Sec63p der Hefe aufzeigte (ca. 20 % identische Aminosäuren), weshalb es im Folgenden als Sec63 bezeichnet wird.

Wie das Sec63p der Hefe besitzt auch das humane Sec63 drei potentielle Transmembranbereiche sowie eine DnaJ-homologe Domäne zwischen dem zweiten und dritten Membrananker. Die vorhergesagte Orientierung des humanen Sec63 in der Membran ist dabei identisch zu der des Hefe-Proteins (Skowronek *et al.*, 1999). Die stärkste Homologie zwischen beiden Proteinen findet man vom zweiten bis zum Ende des dritten Membranankers (40 % Identität zwischen Hefe und Mensch). Interessanterweise sind jedoch einige der Aminosäurereste der DnaJ-homologen Domäne des Sec63p der Hefe, die essentiell für die Interaktion von Sec63p mit Kar2p sind (Schlenstedt *et al.*, 1995), im humanen Sec63 nicht konserviert. Das humane Sec63 besitzt außerdem im Bereich des C-Terminus ein zusätzliches Aminosäuremotiv, das man auch im C-Terminus von 200 kDa Proteinen der U5 snRNPs findet (Laubert *et al.*, 1996).

```

HsSec63  MAGQQFQYDDSGNTFFYFLTSFVGLIVIPATYYLWPR---DQNAE-----QIRLKNIRKVVYGR-CMWYRLR---LLKP
CeSec63  MGRASFYDEVGNTFFYYVLVAFYAILLPATYLCLEPG---ASKPE-----PEHVINEHECQDGCDDKRRQKA-ANKP
AtSec63  MAASEENSALFP IFILTTMAIPLVPYTMVKLSG---ALSK-----KQRTIHQCQCLECD-RSGKYKR---SLFK
ScSec63  MPTNVEYDEASETWP SFILTGLLMVVGPMTLLOIYQIFFGANAEDGNSGKSKEFNVEFKNLNEEYTSDEIKQFRKFKDKNSN
      : : : : : * : : : : :
HsSec63  QPNIIPTVKKIVLLAGWALFLFLAYKVSKT---DREYQYFNPEYVLNLDPGATVAEIKKQYRLLSLKYHPD---KGG--DE-
CeSec63  WRRTKKIITIVVLVAVAWAIFAIIVKKTTEI---EQTHKDYDPYQILGLDQGADEKAIKKAWRDMSKIHHPD---RGG--DA-
AtSec63  KISNFTWSNLTLLVLLWVVMIFLIYYTKNM---SREAQVFDPFILGLEFGVTDSEIKKAYRRLSIQYHPDKNPDPAFDPDSF
ScSec63  KKSkiWSRRNIIIVGWILVAILLQRIINSNDAIKDAATKLFDPYEILGIS TSASDRDIKSAYRKL SVKFHPDKL-AKGLTPDEK
      : : * : : : : : : : : : : * : : : : :
HsSec63  -----VFMRIAKAYAALTDEESRKNWEEFGNPDGPQATSFGLALPAWIVDQK-NS ILVLLVYGLAFMVLFPVVV
CeSec63  -----QFFDKIAKAHQALTDKEARENWEKYGNPDGPATATTFGIALPKWLSKE-YGLWVLAFLYGLIFMIILPVS
AtSec63  FFYAHLLISTEANKYFVEFISKAYQALTDVS SRENFEKYGHFDGQGGFQMGIALPQFLLDIDIGASGGILLWVIGVCILLPLVI
ScSec63  SV-----MEETYVQITKAYESLTDDELVRQNYLKYGHFDGPQSTSHGIALPFLVDGS-ASPLLVVCYVALLGLILPYFV
      * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
HsSec63  GSWWY-RSIRYSGDQILIRTTQIYTYFVYKTRNMDMKRLIMVLGASEFDPQYNKDATSRTDNILIPQLIREIGS INLKKE-
CeSec63  GMWY-SSIKYSADKVLDDTTMYYYF INRTPRMEIGRMIAVLSGSFEFSKQYNKEIQERETDDYEPRLMKQIAGVNDKGKE-
AtSec63  AVIYLSRS SKYTGNVYMHQTL S AYYLMK--P SLAPSKVMEVF TKA AEYMEIP VRRTDDEFLQKLFMS VRSELNLDLKNMKQEQ
ScSec63  SRWWL-RTQSYTKKGIHNV TASN--FIS-----N-----L-----VNYKP SEIVTTDLILHLWSFAHEFKQL-
      : : : * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
      : : : : :
HsSec63  --PPLTCPYSLKARVLLSLHARMKIP---ETLEEDQQFMLKKCPALLQEMVNVICQLIVMARNREEREFRAP--TLASLENCMK
CeSec63  --QPLSQPYALKSRVLLHAYLSLPLES QNDALEEDQSYITRIELFVEEMVN--CSQNLNMGYSQHTK---I-SIETFDNLLK
AtSec63  AKFWKQHPAIVKTELLIQQLTR--ESGVLSPALQGDFFRVLLELAPRLLEELLK--MAVIPRTAQGHGWLRAVGVVLSQCIVQ
ScSec63  --FPDLQPTDFEK--LLQDHINRDSG---KLNNAKFRIVAKCHSLHGLLD--IACGFRNLDIALG-----AINTFKCIVQ
      * : : * : : * : : * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
      : : : : :
HsSec63  LSQMAVQGLQQKSPFLQLPHIEEDNLRVSNHKKYKIKTIQDLVSLKESDRHTLLHLEDE-KYEEVMAVLGSFPYVTMDIKS
CeSec63  LQPMFVQALWQKNSPFLQLPHITDYNLQHLR---KKRVFSCHDLAVIDAETRRSVLRSLSNE-EYRDMVVL S M PRLQIETKT
AtSec63  VLNCSHR--LSSSFYLFVFLSARKSSGVSS---EGISFPLQLPHFSDAVVKIARKKVKSFQDLQEMRLDRSELTLQVAGL
ScSec63  AVPLT-----P-NCQILQLPNVDKEHFTTKT---GDIHTLGLKLTLEDKIGEVLG IKDQA-KLNETLRVASHIPNLKIKAD
      : : : * : : : * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
      : : : : :
HsSec63  QVLDDSDSNITVGLSVTVLTKLTRQTMAEVFEKEQSICAAEEQPAEDGQGETNKNRTKGGVQKSKGPKKTA SKKKPKLKK-
CeSec63  VVEGEDDKHETAGCVVTLKVTMRRLID--PQEAGLADQYKKY AEDG-GDDELEASAP EEAATVEEEVVK--KRKPWEKN
AtSec63  SATDVED-IEKVLEMP SITVDITCETEGE---E-GIQEG-DIVTLQA----WVTLKRNGLVGLALPHAP YF-----P FHK-
ScSec63  FLVPGENQVTPSS TPYISLKV-LVRS AKQP--LIP TSLIPE-ENLTPEQ----DFESQRDP FAMMSKQPLVPYS--FAPFFPT
      : : : : : * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
      : : : : :
HsSec63  KP-TFVLLPQSKQKQ---QKQANGVVGNEAAVKEDE-EEVSD---KGS DSEEEETNRDSQSEKDDGSDRSDREQDEKQNKD
CeSec63  KPKQKKAQGGQKQKFKVKNAPASPDTEKALKEEAKEDDDDEKN SKASDSEDEESG-ASDSEKDGAAAGGD-QKDD-Q---
AtSec63  EENYVLLADSVSNN-VWFSQVY SFLDEGGATAAS-KAISES-----MEGSG-AGVKETNDVAREAE-KVKG-----
ScSec63  KR-RGSWCCLVSSQK---DGK--ILQTP IIIEKLSYKNLND-----DKDFF-DKRIKMDLTKEKFD--IND-----
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
      : : : : :
HsSec63  DEAEWQELQQSIQRKERALLETSKITHPVYSLYFPEEKQEWVWLYIA--DRKEQT--LISMPYHVCTLKDTEEVELKFPAPGK
CeSec63  TDSEWED--DVANSKKSIFETKNTQHTTVHAPFFPTEKFVWVITVAYVDKKEKSRQLLTFPQLVKTLLIDEQTIDIRFAAPPH
AtSec63  ---GSR---LVMG-----KLQAPAEGTYNLTCLCDT--WIGCD---KKQ---ALKVKVLKRTRAGTRGLV SDEGAIAE
ScSec63  ---WEI---GTIK-----IPLGQPAFETVGDFFFR-----VIVK-----STD--YFTTDLDTMNMKVRDSP--
      : : : : : * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
      : : : : :
HsSec63  PGNVQYTVFLRSDSYMGLDQIKPLKLEVHEAKVPVENHPQWDTAIEGDEDQEDSEGFEDESEEEEEEEEEDD
CeSec63  KGIYTYNLSVKSDSYMDAEYSVDFKIDVKEAKFVEIKHD--DYVDEDEDAVEVSS--DDDYTEDDDSDDEE
AtSec63  EGMEEDEIEED--YDDYSEYSEDEDEKK-----D-MDEKRGSKKANGSVKQKKESSSEESGSEEE
ScSec63  -AVEQVEVYSEED--DEYSTDD--DETES-----D--DESDASYTDIDT--DTEAEDDESPE
      : : * : : : * : : : * : : : : * : : : * : : :

```

Abb. 23: Alignment des Säuger Sec63 mit homologen Sequenzen aus anderen Organismen: HsSec63 (*H. sapiens*); CeSec63 (*C. elegans*); AtSec63 (*A. thaliana*) und ScSec63: (*S. cerevisiae*, Sec63p). Identische Aminosäuren im Alignment werden durch Sterne markiert, ähnliche mit Doppelpunkten. Die grau unterlegten Aminosäuren geben vorhergesagte Transmembransegmente wieder. Die DnaJ-homologe Domäne ist schwarz umrandet. Die unterstrichenen Regionen zeigen den Bereich zwischen den verschiedenen Sec63 Proteinen an, der am stärksten konserviert ist. Die durch Edman-Abbau ermittelten Sequenzen aus dem aufgereinigten Säugerprotein werden durch „o“ angezeigt. Das Alignment wurden freundlicherweise von Herrn Dr. E. Hartmann zur Verfügung gestellt.

[illegible]

Das Sec62p Homologe im Menschen besitzt wie das der Hefe zwei putative Transmembransegmente (Abb. 24). Die Bereiche der stärksten Homologie befindet sich in den flankierenden Regionen der Membrananker und der dazwischen liegenden luminalen Domäne (34 % Identität zwischen Hefe und Mensch). Die C- bzw. N-terminalen Bereiche der beiden Proteine sind kaum konserviert. Das humane Sec62 besitzt C-terminal zusätzliche Sequenzmotive, die dem Hefe Sec62p fehlen. Interessanterweise besitzen auch die Sec62p homologen Proteine aus anderen höheren Organismen (*D. melanogaster* und *C. elegans*) dort zusätzliche Sequenzmotive, während sie bei einem weiteren Vertreter der Hefen (*S. pombe*) fehlen.

4.2.2 Charakterisierung des Sec63/Sec61 Subkomplexes

Wie oben gezeigt, findet man BiP und Sec63 assoziiert mit dem trimeren Sec61-Komplex. Vergleicht man die Intensitäten der einzelnen Coomassiebanden in Abb. 22, Bahn 4, miteinander, so fällt auf, daß die Proteinmenge an Sec63 und BiP im Verhältnis zur Menge an Sec61 α um ein Vielfaches geringer ist. Anscheinend ist nicht jeder Sec61-Komplex mit Sec63 oder BiP assoziiert. Eine mögliche Erklärung könnte sein, daß für das Immunopräzipitationsexperiment PK-RM als Ausgangsmaterial verwendet wurden. Dadurch sind nach Görlich und Rapoport (1993) im präparierten Digitoninextrakt neben freiem Sec61-Komplex zum großen Teil auch solche Sec61-Komplexe enthalten, die vor der Hochsalz-Puromycin Behandlung fest mit Ribosomen assoziiert waren. Man kann somit vermuten, daß im Digitoninextrakt nur eine Teilpopulation des Sec61-Komplexes mit Sec63 bzw. BiP assoziiert ist.

Wenn es unterschiedliche Populationen von Sec61-Komplexen im Säuger gibt, sollte es möglich sein, diese Komplexe voneinander zu trennen. Vom reinen trimeren Sec61-Komplex aus Hundepankreas ist bekannt, daß er in einem Digitonin-Niedrigsalzpuffer nicht an den Anionenaustauscher Q-Sepharose bindet (Görlich und Rapoport, 1993). Der heptamere Sec-Komplex der Hefe hingegen bindet daran (Panzner *et al.*, 1995). Zur Isolierung eines Sec63/Sec61-Subkomplexes wurde daraufhin folgendes Experiment durchgeführt. PK-RM aus Rinderpankreas wurden in einem Digitoninpuffer mit 0,5 M Kaliumacetat solubilisiert und nicht gelöste Bestandteile durch Zentrifugation abgetrennt. Der Überstand wurde anschließend über eine HiTrap Q-Sepharose-Säule von Pharmacia gegeben. Nach intensivem Waschen der Säule wurden die gebundenen Proteine stufenweise mit zunehmenden Salzkonzentrationen von 0,6 bis 1,2 M Kaliumacetat eluiert. Aliquots der einzelnen Fraktionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Immunoblotting und Coomassiefärbung analysiert (Abb. 25 A).

Wie zu erwarten, befand sich der Großteil des Sec61-Komplexes im Durchlauf der Q-Säule (Abb. 25 A, Bahn 2). Ein kleiner Teil des Sec61-Komplexes (bis zu 5 % der Gesamtmenge) wurde jedoch an die Q-Säule gebunden. Dieser Teil des Sec61-Komplex eluiert bei 1,0 M Kaliumacetat wieder von der Q-Säule, zusammen mit der Hauptmenge des Sec63 (Abb. 25 A, Bahn 6). Die anschließende Bindung der 1,0 M Kaliumacetat Fraktion an eine anti-Sec61 β Antikörpersäule ergab, daß ein Teil des Sec63 (ca. 30 % der Gesamtmenge des Proteins) assoziiert mit dem Sec61-Komplex vorlag (Abb. 25 B, Bahn 3). Desweiteren konnte gezeigt werden, daß im umgekehrten Fall das gesamte Sec61 α aus dieser Fraktion an eine anti-Sec63 Antikörpersäule band (Daten nicht gezeigt).

Der aus der 1,0 M Kaliumacetat Fraktion isolierte Sec61/Sec63 Komplex wurde auch mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung analysiert (Abb. 25 B, Bahn 3). Es zeigte sich, daß außer Sec61 α und Sec63 keine signifikanten Mengen von weiteren Proteinen im Coomassiegel vorhanden waren (Sec61 β und Sec61 γ sind aufgrund ihrer Größe aus dem Gel herausgelaufen). Das molare Verhältnis von Sec61 α zu Sec63 im Sec61/Sec63 Subkomplex konnte über semiquantitatives Immunoblotting aus vier unabhängigen Komplexpräparationen ermittelt werden (Daten nicht gezeigt). Ein Sec61 α ist dabei im Sec61/Sec63 Subkomplex mit ein bis zwei Sec63 Molekülen assoziiert.

Neben Sec61 α und Sec63 wurde auch der Verbleib von Sec62 auf der Q-Säule untersucht. Sec62 befand sich dabei im Durchlauf der Q-Säule und in der 0,6 M Kaliumacetat Fraktion (Abb. 25 A, Bahn 2 und 4). Immunopräzipitationen aus beiden Fraktionen mit anti-Sec62 Antikörpern ergaben, daß in beiden Fällen keine weiteren Proteine außer Sec62 präzipitiert werden konnten (Daten nicht gezeigt).

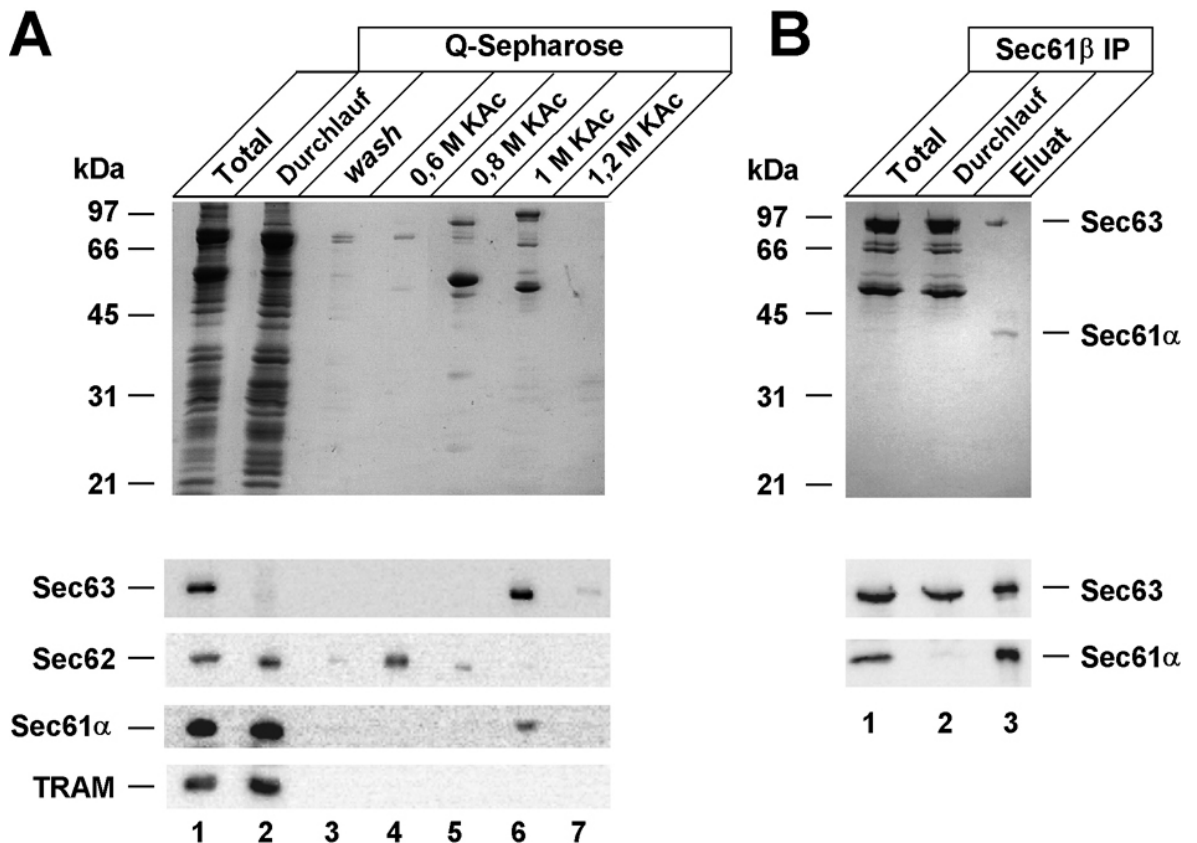


Abb. 25: **Alternative Aufreinigung des Sec63/Sec61-Komplexes.**

A) Die in Digitonin solubilisierten und von unlöslichem Material befreiten Rinder-PK-RM (Total) wurden über eine HiTrap Q Säule gegeben. Nach dem Waschen der Säule (*wash*) wurden die gebundenen Proteine schrittweise durch zunehmende Salzkonzentrationen eluiert. Aliquots der einzelnen Aufreinigungsschritte wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend Coomassie gefärbt (oberer Teil) oder im Immunoblot mit den Antikörpern gegen die angegebenen Proteine (unterer Teil) analysiert. „KAc“ steht für Kaliumacetat.

B) Die 1 M KAc Fraktion (Total) wurde über eine anti-Sec61 β Antikörpersäule gegeben. Nach dem Waschen der Säule wurden die gebundenen Proteine durch Zugabe großer Mengen des Peptides gegen das die Antikörper gerichtet waren, eluiert (Eluat). Aliquots der einzelnen Fraktionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassiefärbung des Gels (oberer Teil) oder Immunoblotting mit Antikörpern gegen die angegebenen Proteine (unterer Teil) analysiert. Bahn 3 der Coomassiefärbung enthält dabei 20x mehr Material als Bahn 1 und 2. Bei der Immunoblotanalyse enthält Bahn 3 die 2,5fache Menge an Material wie Bahn 1 und 2.

4.2.3 Sec62 und Sec63 sind nicht mit membrangebundenen Ribosomen assoziiert

Nach Görlich *et al.* (1992) ist der Großteil des Säuger Sec61-Komplexes im ER fest mit Ribosomen assoziiert. Da die bisherigen Untersuchungen mit PK-RM durchgeführt wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, daß Sec63 und Sec62 in rauen Mikrosomen nicht doch mit Sec61-Komplex assoziiert sind, welcher gleichzeitig auch Ribosomen bindet. Im folgenden sollte daher untersucht werden, ob sich Sec63 und Sec62 wie **Ribosomen assoziierte Membranproteine** (RAMPs) verhalten.

Rauhe Membranen aus Rinderpankreas wurden in einem 450 mM Kaliumacetat-Puffer mit Digitonin oder DeoxyBigChap solubilisiert und anschließend durch eine Saccharosegradienten Zentrifugation aufgetrennt. Die Gradienten wurden fraktioniert und Aliquots der einzelnen Fraktionen mittels SDS-PAGE und Immunoblotting analysiert. Da keine Antikörper gegen ribosomale Proteine zur Verfügung standen, wurden Fraktionen, in denen Ribosomen enthalten waren, anhand des für Ribosomen typischen Protein-Bandenmusters im Coomassiegel identifiziert (Daten nicht gezeigt).

In den mit Digitonin solubilisierten RM (Abb. 26 A) befand sich der Großteil von Sec61 α und Sec61 β sowie ca. 50 % von TRAP α gemeinsam mit den Ribosomen in den Fraktionen 1 bis 10. Sec62, Sec63, das TRAM Protein, die 25 kDa Untereinheit des Säuger SP-Komplexes sowie eine geringe Menge an Sec61-Komplex befanden sich hingegen in den ribosomenfreien Fraktionen 11 bis 19. Ein ähnliches Bild ergab sich bei den in DeoxyBigChap solubilisierten RM (Abb. 26 B), jedoch mit dem Unterschied, daß TRAP α vollständig in den ribosomenfreien Fraktionen zu finden war. Desweiteren zeigte sich, daß die Solubilisierung mit DeoxyBigChap zu etwas mehr freiem, nicht ribosomenassoziierten Sec61-Komplex führt als die Verwendung von Digitonin. In beiden Fällen waren Sec62 und Sec63 unter den gewählten Bedingungen nicht mit Ribosomen assoziiert. Das Ergebnis läßt jedoch nur sehr begrenzte Rückschlüsse auf eine mögliche Beteiligung von Sec62 und Sec63 an co- oder posttranslationalen Transportprozessen zu, da man nach der Solubilisierung der Membran auch das für den cotranslationalen Transport benötigte TRAMP vollständig in den ribosomenfreien Fraktionen findet (siehe Abb. 26 sowie Görlich and Rapoport (1993)).

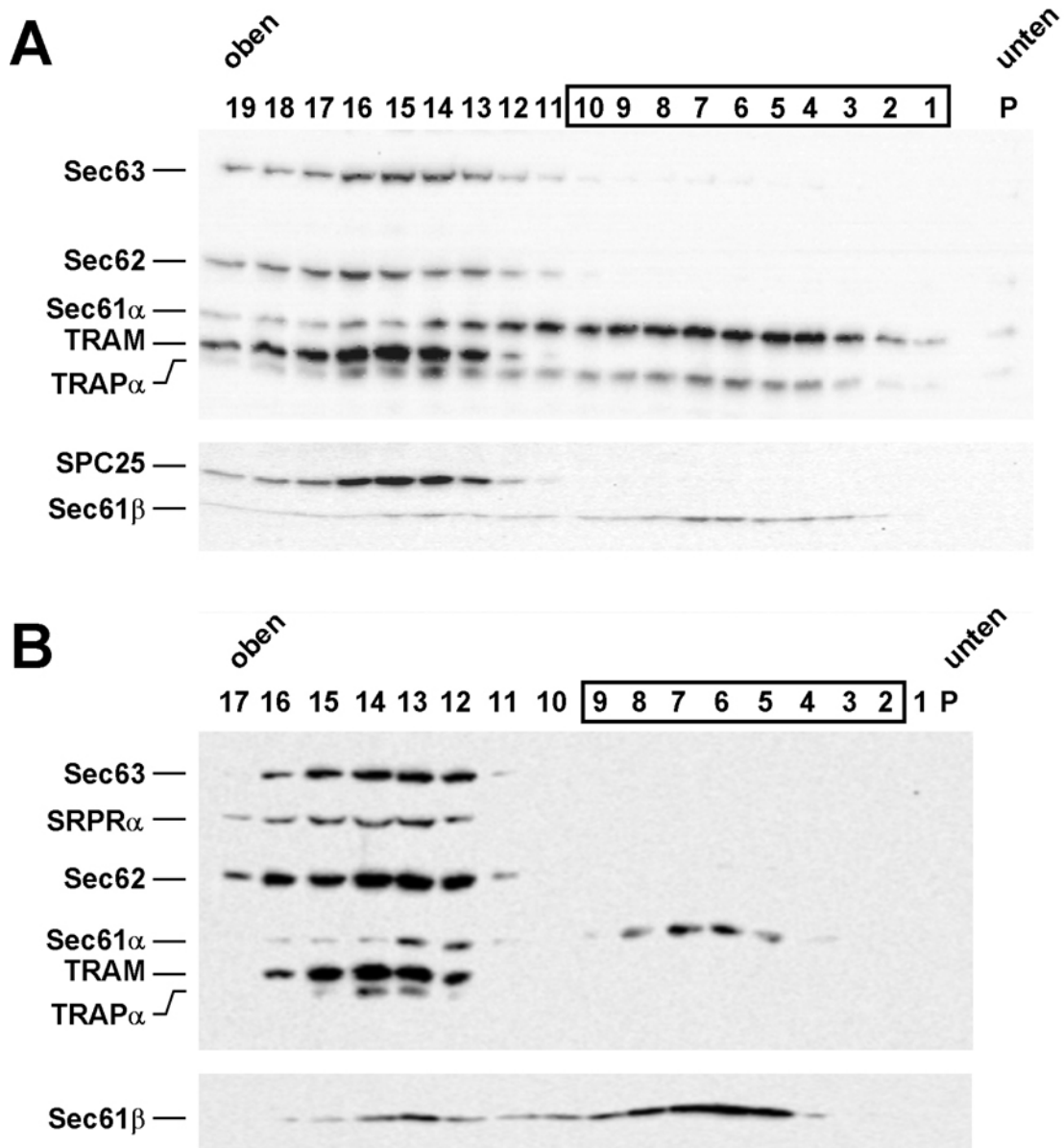


Abb. 26: **Sec62 und Sec63 sind keine ribosomenassoziierten Membranproteine.**

50 eq Rinder-RM wurden in einem Hochsalz-Digitonin-(A) oder Hochsalz-DeoxyBigCHAP-(B) Puffer solubilisiert und anschließend durch eine Saccharose-Gradienten-Zentrifugation aufgetrennt. Die einzelnen Fraktionen der Gradienten wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Immunoblotting mit den angegebenen Antikörpern analysiert. Fraktionen, die ribosomale Proteine enthielten, sind mit einem schwarzen Kasten umrahmt. „P“ steht für Pellet.

4.2.4 Sec62 und Sec63 sind assoziiert mit dem Sec61-Komplex

Wie die oben durchgeführten Saccharose-Gradienten-Zentrifugationen zeigten, waren sowohl Sec63 als auch Sec62 nach Solubilisierung der Membranen nicht mit Ribosomen assoziiert. Für den aus PK-RM aufgereinigten Sec63/Sec61-Komplex würde das bedeuten, daß der Komplex auch in der Membran vor der Puromycin-Hochsalzbehandlung nicht mit Ribosomen assoziiert vorliegt. Wenn diese Annahme richtig ist, sollte es möglich sein, genau wie beim Sec-Komplex der Hefe, den Säuger Sec63/61 Komplex aus solubilisierten RM zu isolieren, nachdem man die Ribosomen und die RAMPs abgetrennt hat. Zu diesem Zweck wurden Rinder-RM zuerst einer Saponin-Extraktion bei 0,8 M Salz unterzogen, um integrale Membranproteine anzureichern (Panzner *et al.*, 1995), und anschließend in einem Digitonin Hochsalzpuffer solubilisiert. Nach Abtrennung der RAMPs durch Zentrifugation wurde der ribosomenfreie Überstand über eine anti-Sec63 Antikörpersäule bzw. über eine anti-Sec62 Antikörpersäule gegeben. Die gebundenen Proteine wurden von der Säule eluiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die coomassiegefärbten Banden durch Peptidsequenzierung analysiert. Im Fall der anti-Sec63 Antikörpersäule konnten Sec63, Sec61 α , Sec61 β , Sec61 γ und eine Kontamination von Immunglobulinen im Eluat identifiziert werden (Abb. 27 A, Bahn 1). Im Eluat der anti-Sec62 Antikörpersäule hingegen waren außer Sec62 keine weiteren Proteine in signifikanten Mengen enthalten (Abb. 27 A, Bahn 2).

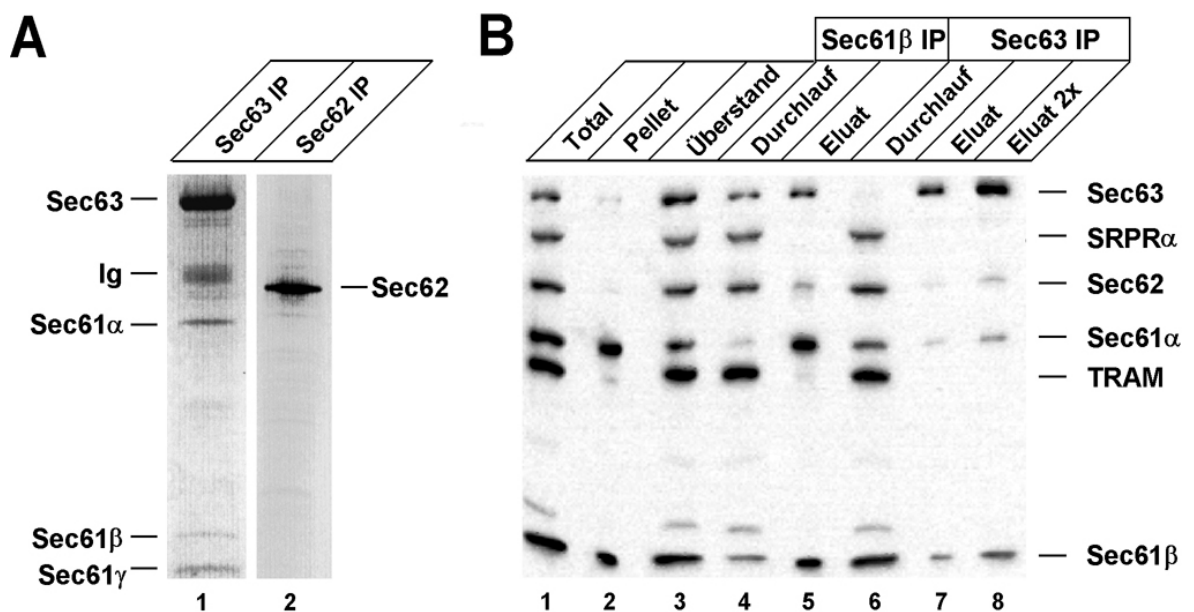


Abb. 27: Ein Teil des Sec61-Komplexes ist mit Sec62 und Sec63 assoziiert.

A) Analyse von Proteinen, die mit Sec63 (Bahn 1) oder Sec62 (Bahn 2) in Digitonin solubilisierten RM assoziiert sind. 2500eq Saponin-Hochsalz gewaschener Rinder-RM wurden in 2,5 % Digitonin, H₅₀ K₅₀₀ Mg₁₀ Gly₁₀ β -Me₅ Pi solubilisiert und anschließend Ribosomen und RAMPs abgetrennt (30 min, 100.000 rpm im TLA 100.3 Rotor). Der Überstand wurde über eine anti-Sec63 Antikörpersäule bzw. eine anti-Sec62 Antikörpersäule gegeben. Die gebundenen Proteine wurden entweder durch Zugabe von 1 % Triton X-100 in 100 mM Glycin pH 2,2 (Bahn 1) oder bei pH 7,8 mit einem Überschuß an Peptid, gegen welches die Antikörper gerichtet waren (Bahn 2), eluiert. Die Eluate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend Coomassie-gefärbt. Die einzelnen Proteinbanden wurden durch Edman-Abbau mit vorheriger Trypsin-Spaltung analysiert.

B) Coimmunoprecipitation von Sec62 und Sec63 mit dem Sec61-Komplex. Rinder-RM wurden in 1,5 % DeoxyBigCHAP, H₅₀ K₄₅₀ Mg_{12,5} Gly₁₀ β -Me₅ Pi solubilisiert und unlösliches Material durch eine „Low-Speed“ Zentrifugation abgetrennt. Vom Extrakt (Total) wurden anschließend Ribosomen und RAMPs durch Zentrifugation abgetrennt (Pellet). Der resultierende Überstand wurde nach Verdünnung mit einem Volumen H₅₀ an eine anti-Sec63 Antikörpersäule bzw. eine anti-Sec61 β Antikörpersäule gebunden (Durchlauf und Eluat). Aliquots (entsprechend 2,5 eq RM) der einzelnen Fraktionen sowie der Eluate der Antikörpersäulen wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblotting mit Antikörpern gegen die angegebenen Proteine analysiert. Bahn 8 (Eluat x2) enthält die doppelte Menge an Material.

Um Bedingungen zu finden, unter denen Sec62 mit anderen Proteinen assoziiert ist, wurden verschiedene andere Detergenzien getestet, unter anderem auch DeoxyBigCHAP. Rinder-RM wurden dazu in einem DeoxyBigCHAP-Hochsalz-Puffer solubilisiert und die RAMPs durch Zentrifugation abgetrennt. Der resultierende Überstand (Abb. 27 B, Bahn 3) wurde anschließend an eine anti-Sec63 Antikörpersäule bzw. an eine anti-Sec61 β Antikörpersäule gebunden und die gebundenen Proteine nach intensivem Waschen der Antikörpersäulen wieder eluiert. Aliquots aller Fraktionen wurden anschließend mittels SDS-PAGE und Immunoblotting analysiert. Es zeigte sich, daß unter diesen Bedingungen die anti-Sec61 β Antikörper nicht nur Sec61 α und Sec63 präzipitierten, sondern zusätzlich auch Sec62 (Abb. 27 B, Bahn 5). Umgekehrt war es auch mit den anti-Sec63 Antikörpern möglich, teilweise Sec61 α , Sec61 β sowie Sec62 zu coimmunopräzipitieren (Abb. 27 B, Bahn 7 und 8), andere Proteine des Translokationsapparates wie die α -Untereinheit des SRP-Rezeptors oder TRAM waren dagegen nicht im Eluat enthalten. Diese Daten lassen vermuten, daß Sec63 und Sec62 zusammen mit dem trimeren Sec61-Komplex im Säuger einen eigenständigen, nicht ribosomenassoziierten Komplex bilden.

Um mögliche weitere Interaktionspartner mit dem neu gefundenen Komplex aus Sec63, Sec62 und Sec61-Komplex zu finden, wurden Quervernetzungsexperimente durchgeführt. Rauhe Membranen aus Rind oder Hund wurden mit dem chemischen *Crosslinker* BMH (Bis-Maleinimidhexan) inkubiert und anschließend mittels SDS-PAGE und Immunoblotting mit anti-Sec62 Antikörpern analysiert. Mehrere Quervernetzungsprodukte zwischen Sec62 und anderen Proteinen konnten dabei beobachtet werden (Abb. 28, Bahn 4). Die Quervernetzungseffizienz variierte je nach RM-Präparation, jedoch waren immer die gleichen Quervernetzungsmuster zu finden (Daten nicht gezeigt). Das häufigste Quervernetzungsprodukt, in dem bis zu 30 % des Sec62 quervernetzt war, konnte durch Immunopräzipitation mit anti-Sec62 Antikörpern und anschließender Peptidsequenzierung der entsprechenden Coomassiebande als Sec61 β identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Die anderen, schwächeren Crosslink-Produkte konnten leider nicht identifiziert werden. Da Sec61 β Bestandteil des Sec61-Komplexes ist, handelte es sich bei dem Quervernetzungsprodukt um keine neu hinzugekommene Komponente, es bestätigte jedoch die vorherigen Ergebnisse aus dem Coimmunopräzipitationsexperimenten.

Ein zentraler Punkt der bisherigen Untersuchungen war neben der Zusammensetzung des neu gefundenen Komplexes die Frage, ob der Komplex mit Ribosomen assoziiert ist. Die bisher gezeigten Daten bezüglich der Ribosomenassoziation bezogen sich immer auf Komplexe, die zuvor durch Detergenzbehandlung aus der Membran herausgelöst wurden. Folglich wäre es denkbar, daß sich Sec62 und Sec63 bei der Solubilisierung der Membran von cotranslationalen Transportkomplexen ablösen. Ein ähnliches Verhalten ist vom TRAM-Protein bekannt, das im Detergenzextrakt nicht mehr mit dem Sec61-Komplex assoziiert ist (Görlich und Rapoport, 1993). Man könnte daher vermuten, daß in der Membran auch cotranslational aktive Komplexe jeweils mit Sec63 und Sec62 assoziiert sind, jedoch durch das Auflösen der Membran diese Interaktion zerstört wird, was auch erklären würde weshalb man im Detergenzextrakt einen hohen Anteil an freiem Sec62 und Sec63 findet.

Insofern sollte geklärt werden, ob das in der Membran mit dem Sec62 quervernetzte Sec61 β zu einen ribosomenassoziierten oder freiem Sec61-Komplex gehört. Durch die chemische Quervernetzung zwischen Sec62 und Sec61 β wird quasi der Zustand in der Membran „eingefroren“, die Dissoziation des Sec62 vom Sec61-Komplex bei der Solubilisierung der Membran wird somit verhindert.

Konkret wurden RM aus Hundepankreas nach der Quervernetzungsreaktion mit BMH in einem Digitonin Hochsalzpuffer solubilisiert. Durch Zentrifugation wurden die Ribosomen sowie die RAMPs von den restlichen Proteinen abgetrennt. Aliquots von Überstand, Pellet sowie vom Ausgangsmaterial wurden anschließend mittels SDS-PAGE und Immunoblotting mit Antikörpern gegen Sec62 analysiert. Sämtliche Crosslink-Produkte des Sec62 sowie auch das restliche freie Sec62 befanden sich im ribosomenfreien Überstand (Abb. 28, Bahn 5 im Vergleich zu Bahn 6). Die Analyse der gleichen Proben im Immunoblot mit anti-Sec61 β Antikörpern hingegen zeigte, daß fast alle Sec61 β Quervernetzungsprodukte in der Pelletfraktion zu finden waren (Abb. 28, Bahn 9). Unter anderem war in der RAMP-Fraktion auch das von Kalies *et al.* (1998) beschriebene Quervernetzungsprodukt zwischen Sec61 β und SPC25 zu finden.

Die Signalpeptidase-Untereinheit SPC25 gehört jedoch ohne Quervernetzungsreaktion nicht zu den RAMPs (siehe Abb. 26 A sowie Kalies *et al.*, 1998). Wenn auch das Sec61 β aus der Sec61 β -Sec62 Quervernetzung zu einem ribosomenassoziierten Sec61-Komplex gehören sollte, müßte die entsprechende Quervernetzungsbande in der Pellet-Fraktion zu finden sein. Wie jedoch aus Abb. 28, Bahn 8 ersichtlich ist, befand sich das Sec61 β -Quervernetzungsprodukt, welches nach dem Laufverhalten im SDS-PAGE dem Sec62-Sec61 β Quervernetzungsprodukt entsprach, vollständig im ribosomenfreien Überstand. Man kann also davon ausgehen, daß das Sec62-Sec61 β Quervernetzungsprodukt nicht ribosomenassoziiert ist.

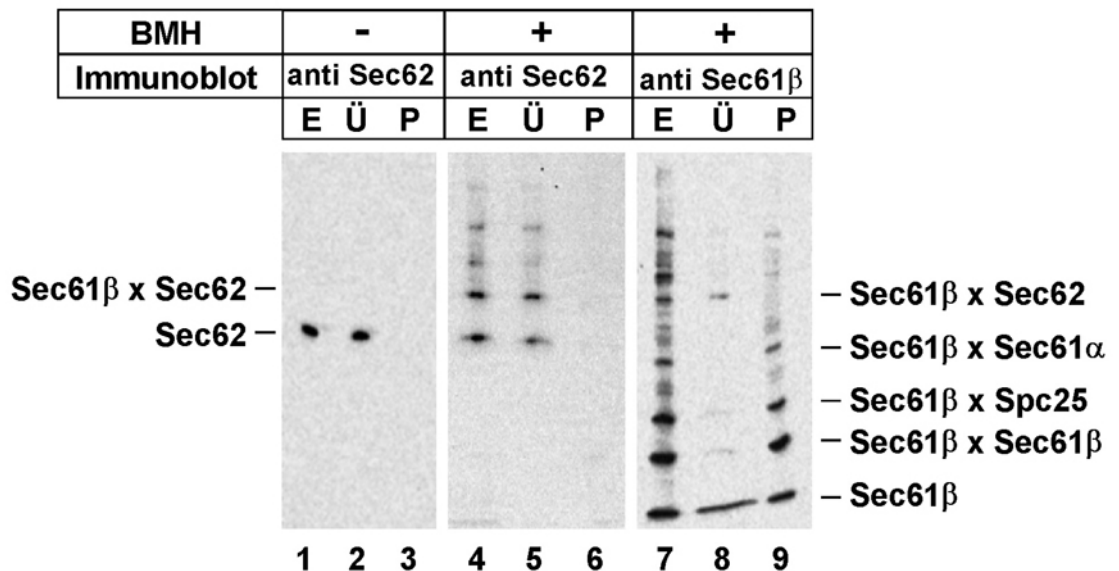


Abb. 28: **Der Sec62-Sec61 β Crosslink ist nicht ribosomenassoziiert.**

Hunde RM wurden mit 50 μ M Bis-Maleinimidhexan (BMH) behandelt. Proben der quervernetzten RM sowie scheinbehandelter RM wurden in 2 % Digitonin und H₅₀ K₅₀₀ M₁₀ Gly₁₀ β -Me₅ Pi solubilisiert und anschließend für 5 min in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert (14.000 rpm). Der Extrakt (E) wurde danach für 10 min bei 100.000 rpm (TLA100 Rotor) zentrifugiert und der resultierende Überstand (Ü) sowie das Pellet (P) mittels SDS-PAGE und Immunoblotting mit anti-Sec62 oder anti-Sec61 β -Antikörpern analysiert. Die Zuordnung der bekannten Sec61 β -Crosslinkprodukte im Immunoblot mit anti Sec61 β Antikörpern erfolgte nach den Daten von Kalies *et al.* (1998).

4.2.5 Zelluläre Expression und Lokalisation von Sec62 und Sec63

Neben der Suche nach Interaktionspartnern von Sec62 und Sec63 interessierte auch die Frage, in welchen Geweben die beiden Proteine exprimiert werden. Aus verschiedenen Organen der Ratte sowie des Rinds wurden zu diesem Zweck angereicherte Membranfraktionen präpariert und mittels SDS-PAGE und Immunoblotting analysiert. Beide Proteine wurden in allen getesteten Geweben exprimiert, wobei Proben aus Organen, die viel ER besitzen (Pankreas- und Lebergewebe) die stärksten Signale im Westernblot zeigten (Abb. 29 A).

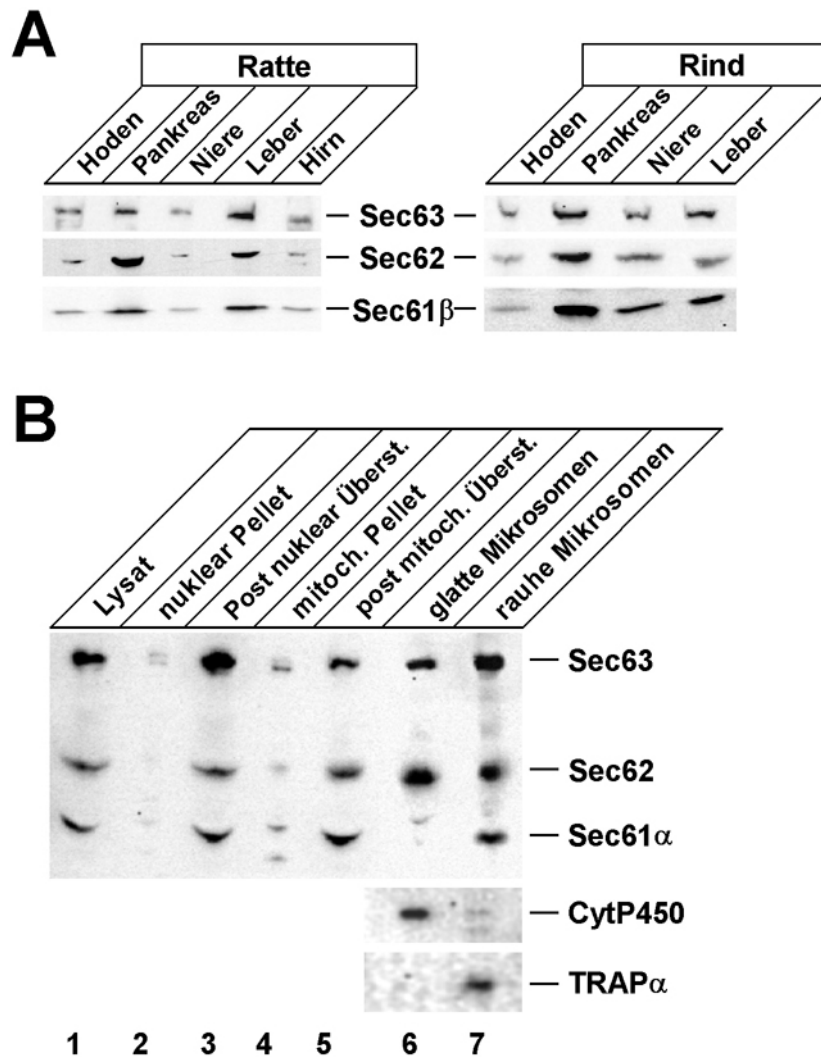


Abb. 29: Sec62 und Sec63 sind im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert.

A) Nachweis von Sec62 und Sec63 in verschiedenen Geweben. Jeweils 70 μ g angereicherte Membranfraktionen aus verschiedenen Rattengeweben oder 3 eq RM aus unterschiedlichen Rindergeweben wurden im SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im Immunoblot mit den angegebenen Antikörpern analysiert.

B) Zellfraktionierung von Rinder-Lebergewebe. Das Gewebe wurde wie in Material und Methoden beschrieben aufgearbeitet. Proben der einzelnen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblotting mit den angegebenen Antikörpern analysiert. Der Immunoblot mit anti TRAP α Antikörpern zeigte, daß die Fraktion glatter Mikrosomen frei von rauhem ER ist. Das Existenz von P450 (CytP450) in der glatten Mikrosomenfraktion weist darauf hin, daß glattes ER enthalten ist.

Um näheres über die intrazelluläre Lokalisierung von Sec62 und Sec63 zu erfahren, wurde eine Zellfraktionierung mit Rinderleber als Ausgangsmaterial durchgeführt. Anschließend wurden Proben der einzelnen Fraktionen im SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Immunoblot mit den angegebenen Antikörpern analysiert (Abb. 29 B). Der größte Teil von Sec62 und Sec63 ist nicht mit dem Kern oder den Mitochondrien assoziiert, sondern befindet sich im postmitochondrialen Überstand. Bei der anschließenden Auftrennung des postmitochondrialen Überstandes in rauhe und übrige Membranen (siehe Material und Methoden) zeigte sich, daß im Gegensatz zu Sec61 α , die beiden Proteine Sec62 und Sec63 nicht ausschließlich im rauhen ER lokalisiert waren, sondern auch in den übrigen Membranen. Im Fall des Sec62 war sogar mehr als die Hälfte des Proteins in den übrigen Membranen lokalisiert.

Die Existenz von P450 in den übrigen Membranen (Abb. 29 B, Bahn 6) sowie die Tatsache, daß Lebergewebe prinzipiell große Mengen an glattem ER enthält, läßt vermuten, daß der überwiegende Teil der übrigen Membranen aus glattem ER besteht. Durchgeführte Immunofluoreszenz-Experimente an HepG2-Zellen zeigten außerdem, daß sowohl anti-Sec62 als auch anti-Sec63 Antikörper jeweils ein typisches retikuläres Netzwerk anfärben und zwar vergleichbar mit dem Bild, daß man mit Antikörpern gegen ein luminales ER-Protein (in diesem Fall: Protein Disulfid Isomerase) findet (Daten nicht gezeigt). Sec62 und Sec63 scheinen somit sowohl im glatten als auch im rauhen ER lokalisiert zu sein.

Um abschließend die Menge von Sec62 und Sec63 in rauhen ER-Membranen aus Rinderpankreas zu bestimmen, wurden quantitative Immunoblotanalysen durchgeführt, wobei aufgereinigtes Sec62, Sec63 sowie Sec61-Komplex als Standards dienten (Daten nicht gezeigt). Ein Äquivalent (Definition siehe Walter *et al.*, 1981) RM enthält dabei 0,35-0,65 pmol Sec62 und 0,25-0,5 pmol Sec63. Außerdem wurde auch die Menge an Sec61 α in den RM bestimmt, sie betrug zwischen 1,1 und 1,6 pmol pro Äquivalent.

5 Diskussion

5.1 Die Signalpeptidase

Anfang der 70er Jahre entdeckte man, daß sekretorische Proteine im Cytoplasma als Vorstufenproteine mit einer abspaltbaren Signalsequenz synthetisiert werden. In den 80er Jahren gelang es, die für die proteolytische Abspaltung des Signalpeptids verantwortliche Signalpeptidase sowohl in der Plasmamembran von *E. coli* (Zwizinski und Wickner, 1980) als auch in der ER-Membran von Säugern (Evans *et al.*, 1986) zu identifizieren. Die Substratspezifitäten der pro- und eukaryontischen Signalpeptidase sind dabei fast identisch. Weiterführende Studien in den 90er Jahren beschäftigten sich mit der molekularen Aufklärung des enzymatischen Mechanismus. Den bisherigen Höhepunkt der Forschung stellt die ermittelte Kristallstruktur des löslichen Anteils der prokaryontischen Leaderpeptidase aus *E. coli* dar (Paetzel *et al.*, 1998). Je mehr man über die pro- und eukaryontische Signalpeptidase in Erfahrung brachte, um so mehr Unterschiede wurden zwischen den beiden Enzymen offensichtlich. Pro- und eukaryontische Signalpeptidasen besitzen verschiedene Katalyse-Mechanismen. Auch bestehen die eukaryontischen Signalpeptidasen der ER-Membran, im Gegensatz zu den prokaryontischen Leaderpeptidasen, aus heteromeren Proteinkomplexen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion von ausgewählter Untereinheiten des Signalpeptidase-Komplexes aus *S. cerevisiae* untersucht, wobei sich neue Einblicke in die Funktionsweise der eukaryontischen Signalpeptidasen ergaben.

5.1.1 Eukaryonten besitzen einen konservierten ER-Signalpeptidase-Komplex

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß die ER-Signalpeptidase der Hefe *S. cerevisiae* aus mindestens vier Untereinheiten besteht. Neben den schon bekannten Untereinheiten Sec11p und Spc1p konnten durch die säulenchromatische Aufreinigung des Komplexes Spc2p und Spc3p als weitere Untereinheiten identifiziert werden. Alle vier Untereinheiten bilden zusammen den SP-Komplex, was auch durch Coimmunopräzipitationsexperimente mit anti-Spc1p sowie anti-Spc2p Antikörpern bestätigt werden konnte. Bei Spc2p und Spc3p handelt es sich um Proteine, die zu den Säuger SP-Untereinheiten SPC25 bzw. SPC22/23 homolog sind. Vergleicht man unter Einbeziehung der neu gefundenen Hefe-Untereinheiten die SP-Komplexe aus Hefe, Hund und Vogel miteinander, zeigt sich, daß die eukaryontischen Signalpeptidasen im Prinzip eine stark konserviert Untereinheiten-Komposition aufweisen (Siehe Abb. 30).

Hefe	Identität	Hund	Vogel
Sec11p	↔ 47 %	SPC21 SPC18	p19
Spc3p *	↔ 26 %	SPC22/23 *	gp23*
Spc2p	↔ 20 %	SPC25	
Spc1p	↔ 17 %	SPC12	

Abb. 30: Untereinheiten der biochemisch isolierten SP-Komplexe aus Hefe, Hund und Vogel.

Die zueinander homologen Untereinheiten aus den verschiedenen Komplexen befinden sich jeweils auf gleichen Ebenen. Die Pfeile mit den angegebenen Zahlen geben die jeweilige prozentuale Identität zwischen den Hefe- und Hundeproteinen wieder. Glycosylierte Proteine sind durch einen Stern markiert. Quellen: Böhni *et al.*, 1988; Kalies und Hartmann, 1996 und Dalbey *et al.*, 1997.

Der tetramere SP-Komplex der Hefe und auch der pentamere SP-Komplex des Säugers enthalten jeweils zwei Membranproteine, deren Polypeptidketten hauptsächlich cytosolisch orientiert sind. In der Hefe handelt es sich dabei um Spc1p und Spc2p im Säuger um SPC12 und SPC25. Da die Abspaltung der Signalsequenzen im Lumen des ER erfolgt, ist eine direkte Beteiligung dieser Untereinheiten an der eigentlichen enzymatischen Reaktion unwahrscheinlich. Wahrscheinlicher ist, daß beide Proteine andere Aufgaben im SP-Komplex übernehmen (näheres siehe unter 5.1.3. und 5.1.4.). Die Existenz von sequenzzhomologen Proteinen zu Spc1p und Spc2p in den Genomen von anderen Eukaryonten wie *C. elegans* oder *A. thaliana* unterstreicht den konservierten Charakter der beiden Untereinheiten im SP-Komplex. Zu beachten ist jedoch, daß die von Baker und Lively (1987) biochemisch aufgereinigte ER-Signalpeptidase aus Huhn-Oviduktzellen keine entsprechenden Untereinheiten enthielt. Nach Auskunft von Herrn Dr. Lively könnte es jedoch so sein, daß das bei der Aufreinigung verwendete Detergenz (NP-40) eine Dissoziation der beiden Untereinheiten vom Rumpfkomples bewirkt hat. Auf alle Fälle existieren auch im Huhn-Genom sequenzzhomologe Proteine zu Spc1p und Spc2p (persönliche Information von Dr. E. Hartmann).

Außer den beiden hauptsächlich cytosolisch orientierten Untereinheiten besitzt die Signalpeptidase der Hefe zwei weitere Membranproteine, deren Polypeptidketten maßgeblich im Lumen des ER lokalisiert sind. Es handelt sich dabei um Sec11p und Spc3p. Interessanterweise findet man im Hund drei Proteine mit entsprechender Orientierung, einerseits SPC22/23, welches homolog zum Spc3p ist, und andererseits zwei zum Sec11p der Hefe homologe Proteine, SPC18 und SPC21. Durch Genbankscreens konnte gezeigt werden, daß viele eukaryontische Spezies wie Huhn, Mensch, Ratte und Frosch jeweils zwei homologe Isoformen zum Sec11p Protein im Genom besitzen (Dalbey *et al.*, 1997). Die Hefe *S. cerevisiae* hingegen besitzt nur Sec11p und keine weiteren Isoformen des Proteins (Goffeau *et al.*, 1996). Gleiches gilt interessanterweise auch für die Invertebraten *C. elegans* und *D. melanogaster* (persönliche Mitteilung von Dr. E. Hartmann). Scheinbar erfolgte die Verdoppelung der Untereinheit im Genom erst mit der Evolution der höheren Eukaryonten.

Man geht heute davon aus, daß Sec11p die katalytisch aktive Untereinheit des Hefekomplexes darstellt (näheres siehe unter 2.2.3. sowie 5.1.2.). Unklar ist hingegen, weshalb in höheren Eukaryonten zwei Isoformen des Sec11p Proteins im Komplex vorkommen und welche Funktion damit verbunden ist. Theoretisch wäre denkbar, daß SPC18 und SPC21 unterschiedliche Substratspezifitäten aufweisen, ähnlich wie es für die Signalpeptidasen Imp1p und Imp2p aus der inneren mitochondrialen Membran gezeigt werden konnte (Nunnari *et al.*, 1997). Auch wäre es möglich, daß die beiden Proteine nicht gemeinsam im gleichen Komplex vorkommen, sondern entweder SPC18 oder SPC21 alleine mit den drei anderen Untereinheiten assoziiert ist. Die Identifizierung der Säuger-ER-Signalpeptidase durch Evans *et al.* (1986) erfolgte durch säulenchromatographische Aufreinigung. Da jedoch die beiden Isoformen fast identisch sind, kann nicht ausgeschlossen werden, daß die aufgereinigte Signalpeptidase nicht aus einem pentameren Komplex, sondern aus zwei sich in einer Untereinheit unterscheidenden, tetrameren Komplexen bestand. Coimmunopräzipitationsexperimente mit anti-SPC21 bzw. anti-SPC18 Antikörpern, die diese Frage hätten klären können, wurden leider nicht durchgeführt.

Die zweite überwiegend luminal orientierte Untereinheit des SP-Komplexes der Hefe ist das oben schon erwähnte Spc3p. Das Protein liegt als Glycoprotein in der Membran vor und zeigt somit die gleiche Modifikation wie die entsprechenden homologen Untereinheiten aus Säuger und Vogel (Lively *et al.* 1994.). Interessanterweise besitzen alle bisher in eukaryontischen Sequenzdatenbanken vorhandenen Spc3p-homologe Proteine potentielle Glycosylierungsstellen in ihrer Aminosäuresequenz. Somit ist nicht nur die Untereinheit selber konserviert, sondern wahrscheinlich auch ihr glycosylierter Zustand in der Membran.

5.1.2 Sec11p und Spc3p werden für die katalytische Aktivität der ER-Signalpeptidase benötigt

Neben Sec11p ist auch die Spc3p Untereinheit des Hefe SP-Komplexes essentiell für das Überleben der Zelle. Die Deletion von *SPC3* bewirkt den Verlust der Spaltungsaktivität, was sich *in vivo* als lethal wirkende Präkursor-Akkumulation manifestiert. Somit zeigt die Depletion von *SPC3* ähnliche Effekte, wie sie auch schon für *SEC11* beschrieben wurden (Böhni *et al.*, 1988). Die Analyse des verbleibenden SP-Komplexes während des *SPC3* Abschaltexperimentes ergab, daß Spc3p eine wichtige Rolle für die Stabilität des SP-Komplexes in der Membran spielt. Der Verlust von Spc3p führt zur einer drastischen Abnahme von Spc1p und Sec11p in der ER-Membran, wohin gegen Spc2p sich bei einer niedrigeren Konzentration stabilisiert. Insofern war unklar, ob die beobachteten Spaltungsdefekte bei der Spc3p-Depletion nicht primär auf den parallelen Verlust der eigentlichen katalytisch aktiven Sec11p Untereinheit zurückzuführen waren. Weitere Experimente zeigten jedoch, daß eine Überexpression von Sec11p in einem $\Delta spc3$ Stamm die Zellen nicht retten kann. Im komplementierten $\Delta spc3$ Stamm mit zusätzlich überexprimiertem Sec11p zeigte sich auch, daß nach dem Abschalten von *SPC3* der noch vorhandene restliche Komplex aus Sec11p, Spc1p und Spc2p keine Spaltungsaktivität besaß, die über das Hintergrundniveau hinaus ging. Die Menge an Sec11p in der Membran entsprach zu diesem Zeitpunkt noch etwa der normalen wt-Menge.

Anzumerken ist jedoch, daß die gleichzeitige Überexpression von Sec11p und Spc3p am Anfang des Abschaltexperimentes nicht zu einer signifikant höheren *in vitro* Signalpeptidaseaktivität führte. Eine mögliche Ursache dafür könnte die limitierte Menge der beiden nicht überexprimierten Untereinheiten Spc1p und Spc2p sein. Die beiden Proteine sind zwar nicht essentiell für die Hefe, jedoch kann man davon ausgehen, daß sie die Bildung eines stabilen und aktiven Minimalkomplexes aus Sec11p und Spc3p in der Membran begünstigen (siehe auch 5.1.3.). Desweiteren kann nicht ausgeschlossen werden, daß für die richtige Assemblierung und Stabilisierung der beiden essentiellen Untereinheiten des Komplexes weitere Komponenten des Translokationsapparates benötigt werden, die sich wiederum in dieser Situation als limitierend auswirken könnten.

Die Entdeckung, daß neben Sec11p auch Spc3p essentiell für die Spaltungsreaktion ist, wirft die Frage auf, wie ähnlich eukaryontische und prokaryontische Signalpeptidasen zueinander sind. Die Sec11p Untereinheit entspricht wahrscheinlich primär der monomeren Leaderpeptidase der Prokaryonten, wobei jedoch festzuhalten ist, daß die allgemeine Ähnlichkeit zwischen Sec11p und LepB aus *E. coli* sehr gering ist. Die verwandtschaftliche Beziehung zwischen den beiden Proteinen ist vielmehr durch drei separate homologe Regionen begründet (Box I, II und III), die man sowohl im periplasmatischen Anteil von LepB als auch im luminalen Anteil von Sec11p findet (Dalbey und van Heijne, 1992; van Dijk *et al.*, 1992). Die Box I enthält das für die enzymatische Aktivität essentielle Serin, welches man bei allen Typ I Signalpeptidasen findet (Sung und Dalbey, 1992; van Valkenburgh *et al.*, 1999). Box II umfaßt einen Sequenzbereich, dessen zentraler Bestandteil ein Lysin bei den prokaryontischen bzw. ein Histidin bei den eukaryontischen Signalpeptidasen ist, wobei der jeweilige Aminosäurerest essentiell für die Spaltungsreaktion ist (Tschantz *et al.*, 1993; van Valkenburgh *et al.*, 1999). Die Box III, die nicht am katalytischen Zentrum beteiligt ist, ist am wenigsten konserviert. Der innerhalb der prokaryontischen Leaderpeptidasen gut konservierten Region kann man im Sec11p der Hefe nur einen Bereich von 4 Aminosäuren zuordnen (Sung und Dalbey, 1992).

Welche Rolle spielt Spc3p bei der Spaltungsreaktion? Prinzipiell kann nicht ausgeschlossen werden, daß Spc3p nur als Faltungshilfe oder Stützgerüst für das eigentlich katalytisch aktive Sec11p benötigt wird. Wahrscheinlicher ist jedoch, daß Spc3p an der Spaltungsreaktion beteiligt ist. Man findet am C-Terminus von Spc3p eine hydrophobe Region, die auch bei allen anderen bisher identifizierten Spc3p-homologen Proteinen anzutreffen ist. Durch C-terminal verkürzte Varianten von Spc3p konnte gezeigt werden, daß dieser Bereich des Proteins essentiell für das Überleben der Zelle ist. Es wäre denkbar, daß diese Domäne eine Rolle bei der Substratbindung spielt, entweder alleine oder in Kombination mit Sec11p.

Aufgrund der Kristallstrukturdaten der Leaderpeptidase von *E. coli* weiß man, daß sich der periplasmatische Anteil des Enzyms aus zwei verschiedenen Domänen zusammensetzt (Paetzel *et al.*, 1998). Die katalytisch aktive Domäne des Proteins enthält dabei die beiden konservierten Boxen I und II, wohingegen Box III in der anderen Domäne lokalisiert ist. Folgt man ferner den von van Valkenburgh *et al.* (1999) durchgeführten Sequenzvergleichen zwischen der prokaryontischen Leaderpeptidase aus *E. coli* und Sec11p sowie Spc3p, so ergibt sich folgendes interessantes Bild: Im luminalen Anteil von Spc3p gibt es Sequenzhomologien zur nicht katalytischen Domäne der Leaderpeptidase einschließlich der Box III (siehe Abb. 31). Desweiteren ist das 167 Aminosäuren lange Sec11p nur halb so lang wie die 323 Aminosäuren messende Leaderpeptidase, wobei vor allem der Sequenzbereich der nicht katalytischen Domäne zwischen den Boxen II und III im Sec11p fehlt. Damit liegt die Vermutung nahe, daß die luminalen Anteile von Sec11p und Spc3p die beiden verschiedenen Domänen des periplasmatischen Teils der prokaryontischen Leaderpeptidase repräsentieren. Zusammen bilden sie die funktionell aktive Signalpeptidase in der ER-Membran.

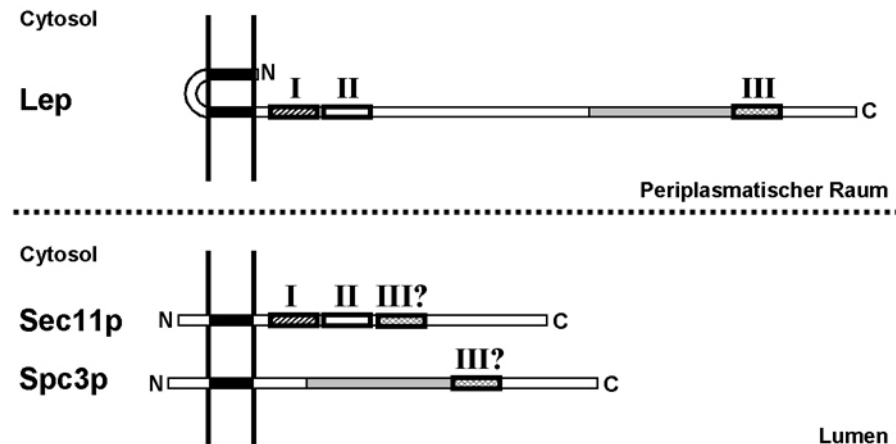


Abb. 31: **Schematische Darstellung von LepB, Sec11p und Spc3p.**

In den Proteinen sind jeweils die Positionen der für Typ I Signalpeptidasen charakteristischen konservierten Boxen I bis III durch Umrahmungen dargestellt. Die zusätzlich mit „?“ gekennzeichneten Boxen deuten an, daß in diesen Fällen nur schwache Homologien existieren. Die grau unterlegten Bereiche in den Proteinen LepB und Spc3p stellen den homologe Bereiche zwischen den beiden Proteinen dar (nach Valkenburgh *et al.*, 1999). Die schwarzen Abschnitte im Protein stellen die Transmembransegmente dar.

Eine Ursache des komplexeren Aufbaus der eukaryontischen Signalpeptidasen könnte sein, daß der Komplex in der ER-Membran neben der eigentlichen Spaltung von Signalsequenzen noch andere proteolytische Funktionen übernimmt. Auffällig ist dabei, daß die Substratspezifität der ER-Signalpeptidasen weiter gefächert ist als die der prokaryontischen Leaderpeptidasen. So konnte *in vivo* gezeigt werden, daß in Hefen Signalsequenzen prozessiert werden, die direkt nach der Schnittstelle ein Prolin besitzen (Plath und Hartmann, unveröffentlichte Daten). Die Leaderpeptidase aus *E. coli* ist hingegen nicht in der Lage, eine solche Signalsequenz abzuspalten (Nielsson und von Heijne, 1992). Außerdem gibt es Hinweise, daß die ER-Signalpeptidase am Abbau der Signalpeptide beteiligt ist (Lyko *et al.*, 1995), sowie Untersuchungen, daß der SP-Komplex bei der Degradation von bestimmten Membranproteinen benötigt wird (Mullins *et al.*, 1995). Die ER-Signalpeptidase scheint also neben der Prozessierung von Signalsequenzen auch beim Abbau von hydrophoben Proteinfragmenten aus der Doppellipidmembran eine Rolle zu spielen. Zu erwähnen ist außerdem, daß man in vielen Membranproteinen kryptische, unvollständige Signalpeptidase-Schnittstellen findet. Denkbar wäre in diesem Zusammenhang also, daß zwei Untereinheiten für die katalytische Aktivität benötigt werden, zum Zwecke der Regulation oder Substraterkennung, damit nicht unspezifisch intakte Membranproteine gespalten werden.

5.1.3 Spc1p und Spc2p unterstützen die Spaltungsaktivität des SP-Komplexes

Die Untereinheiten Spc1p und Spc2p des SP-Komplexes sind beide nicht essentiell für das Überleben der Zelle. Die Einzeldelensionsstämme sowie der Doppeldelensionsstamm beider Proteine zeigen bei Inkubationstemperaturen bis 38 °C keine Unterschiede zu den entsprechenden Wildtypstämmen. Inkubiert man jedoch den $\Delta spc2$ Stamm oder den $\Delta spc1/\Delta spc2$ Stamm bei 42 °C, so findet man *in vivo* eine nicht lethale Akkumulation von sekretorischen Vorstufenproteinen (Mullins *et al.*, 1996). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß für die beobachtete Präkursorakkumulation wahrscheinlich zwei verschiedene Effekte verantwortlich sind. Einerseits wurde demonstriert, daß der Verlust von SPC2 zu einer Reduzierung der Konzentration der anderen Untereinheiten in der Membran führt. Dieses Phänomen ist unabhängig von der Inkubationstemperatur der Zellen (persönliche Mitteilung von W. Antonin). Die Proteinmengen von Sec11p und Spc3p reduzieren sich auf die Hälfte des entsprechenden Wildtypniveaus, und Spc1p ist überhaupt nicht mehr in der ER-Membran nachweisbar. Zweitens konnte im *in vitro* Spaltungsassay gezeigt werden, daß der Komplex aus Sec11p und Spc3p ohne Spc1p und Spc2p für das getestete Substrat eine um die Hälfte reduzierte Spaltungsaktivität besitzt, verglichen mit der entsprechenden Menge (bezogen auf Sec11p und Spc3p) des vollständigen tetrameren SP-Komplexes. Was genau diese verstärkende Wirkung von Spc1p und Spc2p hervorruft, ist nicht geklärt. Denkbar ist, daß die membranspannenden Regionen von Spc1p und Spc2p unterstützend bei der Bindung der hydrophoben Signalsequenz mitwirken. Desweiteren wäre möglich, daß der Minimalkomplex aus Sec11p und Spc3p durch Spc1p und Spc2p in seiner funktionellen Konformation stabilisiert wird. Für Spc1p konnte in diesem Zusammenhang schon gezeigt werden, daß die Überexpression des Proteins teilweise eine lethale temperatursensitive Sec11p Mutante subprimiert (Fang *et al.*, 1996).

Der Verlust von Spc2p führt also zu einer verminderten Anzahl an SP-Minimalkomplexen, die außerdem in ihrer Aktivität eingeschränkt sind. Da sich beide Effekte summieren, sollte der $\Delta spc2$ Stamm bzw. der $\Delta spc1/\Delta spc2$ Stamm jeweils nur noch ein Viertel der Spaltungsaktivität eines entsprechenden Wildtypstammes besitzen. Da unter normalen Wachstumsbedingungen keine *in vivo* Präkursorakkumulation in den Stämmen zu beobachten ist, kann man davon ausgehen, daß die verbliebene Aktivität der Signalpeptidase ausreicht, um alle Signalpeptide noch während des Translokationsprozesses abzuspalten. In einer Streßsituation, wie sie die Inkubation bei 42 °C darstellt, ist die reduzierte Spaltungsaktivität anscheinend nicht mehr ausreichend, um sämtliche der nun viel zahlreicher ins ER transportierten Proteine zu prozessieren.

5.1.4 Der SP-Komplex interagiert mit der Translokationspore

Die Signalsequenzen von sekretorischen Proteinen werden noch während der Translokation vom eigentlichen Protein abgespalten (Perara *et al.*, 1986). Daß die Signalpeptidase sich dabei in unmittelbarer Nähe der Translokationspore befindet, konnten Kalies *et al.* (1998) in chemischen Quervernetzungsexperimenten mit Mikrosomen aus Säuger zeigen. Konkret demonstrierten sie, daß während des cotranslationalen Transportes die β -Untereinheit des Sec61-Komplexes mit der SPC25-Untereinheit des SP-Komplexes quervernetzt werden kann. Anhand der Quervernetzungsdaten konnte jedoch nicht geklärt werden, ob die relative Nähe zwischen den beiden Komplexen auf eine direkte Interaktion der beiden Komponenten zurückzuführen ist, oder auf die Tatsache, daß beide Komplexe gleichzeitig, aber unabhängig voneinander, mit dem Ribosom interagieren.

In der vorgelegten Arbeit konnte nun durch Coimmunopräzipitationsexperimente gezeigt werden, daß der SP-Komplex der Hefe mit den β -Untereinheiten des Sec61- sowie des Ssh1-Komplexes interagiert, und zwar ohne daß Ribosomen benötigt werden. Im Detail zeigten die Coimmunopräzipitationen, daß sich mit anti-Spc1p bzw. anti-Spc2p Antikörpern ca. 5 bis 10 % der Gesamtmenge der jeweiligen beiden β -Untereinheiten, jedoch überhaupt nicht die α -Untereinheit des Sec61p-Komplexes fällen ließ. Dieses verwundert natürlich, da unter den gewählten Pufferbedingungen der Sec61p-Komplex normalerweise stabil ist. Eine Erklärung für dieses Phänomen könnte sein, daß ein Teil der Sbh1p bzw. Sbh2p Population nicht mit Sec61p bzw. Ssh1p-Komplexen assoziiert ist, sondern unabhängig davon mit dem SP-Komplex. Einen weiteren Hinweis, daß diese Hypothese zumindest für Sbh2p gilt, zeigten die Abschaltexperimente im $\Delta spc2$ Stamm. Finke *et al.* (1996) konnten zeigen, daß im Gegensatz zu Sbh1p, Sbh2p *in vivo* instabil wird, wenn es nicht mit einer α -Untereinheit wie Sec61p oder Ssh1p interagieren kann. In dieser Arbeit wurde demonstriert, daß ein ähnlicher Effekt auftritt, wenn man die Menge an Spc2p in der Zelle reduziert. Konkret wurde gezeigt, daß nach dem vollständigem Verlust von Spc2p die Menge

an Sbh2p in der Membran nur noch 20 % des entsprechenden Wildtypniveaus beträgt. Schaltet man anschließend die Expression von Spc2p wieder an, so erholt sich auch die Menge an Sbh2p auf das ursprüngliche Wildtypniveau zurück. Somit liegt die Vermutung nahe, daß der SP-Komplex mit Sbh2p über die Spc2p Untereinheit interagiert. Spc1p, das im $\Delta spc2$ Stamm auch vollständig in der Membran fehlt, spielt hingegen bei der Interaktion mit Sbh2p keine tragende Rolle, da im $\Delta spc1$ Stamm keine Reduzierung der Menge an Sbh2p beobachtet werden konnte. Durch den Wegfall der Spc2p Untereinheit hat wahrscheinlich ein Teil der Sbh2p-Population keinen Interaktionspartner mehr und wird in der Membran instabil. Interessant ist in diesem Zusammenhang die extrem starke Abnahme der Sbh2p Menge um 80 %, was vermuten läßt, daß in der Membran eine größere Menge an Sbh2p vorhanden ist, die primär nicht fest mit dem trimeren Ssh1-Komplex assoziiert ist. Über die Funktion von Sbh1p bzw. Sbh2p am SP-Komplex kann man nur spekulieren. Es wäre denkbar, daß die beiden Proteine als eine Art Vermittler zwischen dem SP-Komplex und den Sec61 bzw. Ssh1-Komplex fungieren (Siehe Abb. 32)

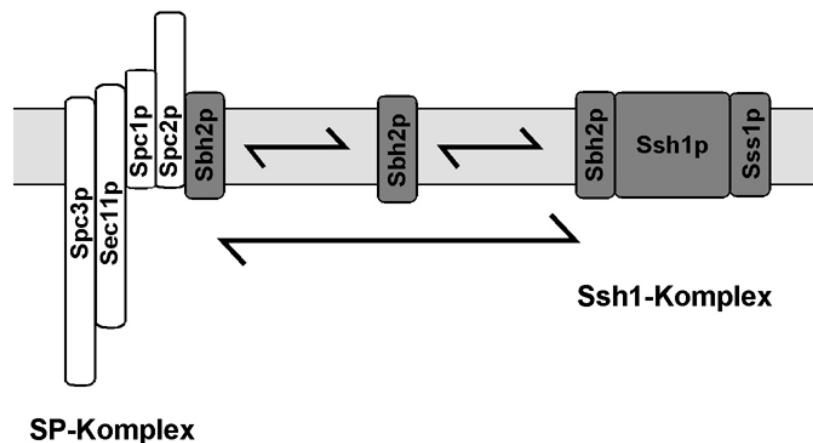


Abb. 32: **Mögliche Funktion von Sbh2p bei der Interaktion mit dem SP-Komplex.**

In der ER-Membran liegt nicht die gesamte Population von Sbh2p fest assoziiert im Ssh1-Komplex vor, sondern ein Teil interagiert über Spc2p mit dem SP-Komplex. Dadurch wird es wahrscheinlich dem SP-Komplex erleichtert, während des Translokationsprozesses engen Kontakt zu der im Translokationskanal befindlichen Signalsequenz aufzunehmen. Desweiteren kann nicht ausgeschlossen werden, daß es freies Sbh2p in der Membran gibt.

5.2 Identifizierung eines Sec-Komplex ähnlichen Translokationskomplexes im Säuger

5.2.1 Säuger-Sec61 α ist assoziiert mit Sec62 und Sec63

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente zeigen, daß in der ER-Membran von Säugern ein Membranproteinkomplex existiert, der Ähnlichkeiten zum Sec-Komplex der Hefe aufweist. Der neu gefundene Komplex besteht aus dem trimeren Sec61-Komplex sowie zwei weiteren Membranproteinen, die Homologien zum Sec62p bzw. zum Sec63p der Hefe besitzen. Der heptamere Sec-Komplex der Hefe und der neu gefundene pentamere Säuger Sec61/62/63 Komplex weisen jedoch neben den strukturellen Ähnlichkeiten auch einige interessante Unterschiede auf.

Zum einen findet man signifikante Sequenzhomologien zwischen Hefe und Säuger Sec62 bzw. Sec63 nur in den putativ luminalen Anteilen der Polypeptidketten sowie in den cytosolischen Bereichen nahe der Membrananker. Die weiter distal liegenden cytosolischen Bereiche der Proteine aus Hefe und Säuger unterscheiden sich sehr stark voneinander. Die beiden Säugerproteine besitzen zusätzliche Sequenzmotive. Besonders interessant ist dabei ein Motiv im Sec63, welches man auch im C-Terminus von 200 kDa Proteinen der U5 snRNPs findet und das dort wahrscheinlich mit RNA interagiert (Lauer *et al.*, 1996).

Außerdem war es in der vorliegenden Arbeit nicht möglich, weder mit biochemischen Ansätzen noch durch Sequenz-Datenbanksuche, Säuger-Homologe zu Sec71p oder Sec72p zu finden. Sec71p und Sec72p sind in der Hefe am Erkennungsschritt der Signalsequenzen im Cytoplasma beteiligt, wobei jedoch ihre Funktion für das Überleben der Zelle nicht essentiell ist. Denkbar wäre es, daß die zusätzlichen cytosolischen Bereiche des Säuger Sec62 bzw. des Sec63 Proteins die beiden Hefe-Proteine in ihrer Funktion ersetzen. Endgültig kann jedoch die Frage nach der Existenz von Sec71p und Sec72p homologen Proteinen im Säuger hier nicht geklärt werden.

Weitere Punkte, in dem sich der Säuger Sec61/62/63 Komplex vom Sec-Komplex der Hefe unterscheidet, sind die relative Anzahl von Komplexen in der ER-Membran, sowie die generelle Stabilität des Komplex nach Solubilisierung der Membran. In der Hefe liegt ca. ein Drittel aller Sec61-Komplexe assoziiert mit dem Sec62/Sec63 Subkomplex vor. Außerdem findet man in mit Digitonin solubilisierten Hefe-Mikrosomen keine freien Sec62/Sec63 Subkomplexe, alle Sec62/Sec63 Subkomplexe sind fest mit Sec61-Komplexen assoziiert (persönliche Mitteilung von Dr. S. Panzner).

Bei Mikrosomen aus Rinderpankreas hingegen sind nach der Solubilisierung nur ca. 5 % des Sec61 α mit Sec63 assoziiert. Die gewählten Solubilisierungsbedingungen entsprachen dabei im Prinzip der Präparation des Sec-Komplexes aus der Hefe nach Panzner *et al.* (1995), wobei jedoch im Säuger noch ca. 2/3 der Sec63-Menge als freies, nicht mit Sec61 α assoziiertes Protein im Detergenzextrakt enthalten ist. Berücksichtigt man, daß in den isolierten Sec61-/Sec63 Komplexen das Verhältnis zwischen Sec61 α zu Sec63 1:1 bis 1:2 betrug, so würde die Gesamtmenge des Sec63 in der Membran ausreichen, um maximal mit 15 % der Sec61-Komplexe assoziiert zu sein, ein deutlich geringerer Anteil als in der Hefe.

Im Gegensatz zu Sec63, wo eine Teilpopulation des Proteins in Lösung fest mit dem Sec61-Komplex assoziiert bleibt, ist die Interaktion von Sec62 mit dem Sec61-Komplex sehr viel labiler. Unter optimierten Bedingungen wurden nur maximal 15 % des Sec62 bei Coimmunopräzipitation mit anti-Sec61 β Antikörper mitgefällt. Quervernetzungsexperimente ergaben unabhängig davon, daß ca. 30 % der Sec62 Population mit ca. 5 % der Sec61 β Population in der Membran vernetzt werden konnten. Das läßt vermuten, daß Sec62 und Sec63 wahrscheinlich in etwa in gleichen Mengen im pentameren Komplex vorkommen. Unterstützt wird diese Annahme durch die Tatsache, daß die ermittelten Proteinkonzentrationen von Sec62 (0,35-0,65 pmol/eq) und Sec63 (0,25-0,5 pmol/eq) in RM aus Rinderpankreas die gleiche Größenordnung haben.

Säuger Sec62 und Sec63 wurden in allen getesteten Geweben exprimiert, wobei in Geweben mit hohem ER-Anteil auch die größten Mengen der beiden Proteine zu finden waren. Interessanterweise befanden sich Sec62 und Sec63 jedoch nicht nur im rauhen ER, sondern insbesondere Sec62 auch im glatten ER. Über die funktionelle Bedeutung der Proteine im glatten ER ist bisher noch nichts bekannt. Der Sec61-Komplex findet sich nicht im glatten ER und steht somit als Interaktionspartner nicht zur Verfügung. Die Beobachtung, daß die Membranen des glatten ER Sec62 enthalten, wird durch die Tatsache unterstützt, daß sich im Nebennierengewebe große Mengen an Sec62 Protein befinden (persönliche Mitteilung von Herrn H. Grau), und daß große Mengen an Sec62 mRNA nicht nur in Leber- und Pankreasgewebe zu finden sind, sondern auch in Muskelgewebe (Daimon *et al.*, 1997).

5.2.2 Mögliche Funktion des pentameren Säuger- Sec61/62/63 Komplexes

Die Funktion des pentameren Sec61/62/63 Komplex in der ER-Membran ist unklar. Anhand der vorliegenden strukturellen Daten kann man nur spekulieren, an welchen Transportprozessen der Komplex beteiligt sein könnte. An erster Stelle steht die Möglichkeit, daß der Sec61/62/63 Komplex den posttranslationalen Transport in der ER-Membran von Säugern vermittelt (Abb. 33 A). Prinzipiell besitzt der Komplex alle Untereinheiten, die auch in der Hefe essentiell notwendig sind, um diese Art von Transport durchzuführen. Dabei ist jedoch zu bedenken, daß sich die cytosolischen Bereiche des Sec61/62/63 Komplexes von denen des Sec-Komplexes der Hefe sehr stark unterscheiden. Auch werden sekretorische Proteine wie PräPro- α -Faktor oder PräPro-OmpA zwar *in vitro* posttranslational durch die ER-Membran von Hefen transportiert, jedoch nicht in rauhe Mikrosomen von Säugerzellen (Wiedmann *et al.*, 1988). In der Säugerzelle erfolgt der Transport von Proteinen ins ER hauptsächlich cotranslational. Die einzigen bekannten Substrate, für die *in vitro* gezeigt werden konnte, daß sie in einem SRP-unabhängigen Prozeß über die Säuger ER-Membran gelangen, sind kurze Membranprotein-Präkursor wie M13 procat (Watts *et al.*, 1983) oder kurze Präkursoren von hydrophoben sekretorischen Proteinen wie z.B. PräPro-Cecropin (Zimmermann *et al.*, 1990). Für PräPro-Cecropin gibt es Hinweise, daß Membranproteine den Transport des Substrates durch die Säuger ER-Membran bewerkstelligen (Zimmermann *et al.*, 1986; Klappa *et al.*, 1994), während in *E. coli* gezeigt werden konnte, daß M13 procat auch ohne zusätzliche Membrankomponenten durch die Membran transportiert wird (Wolfe *et al.*, 1985). Die Beteiligung des Sec61/62/63 Komplexes am Transport von kurzen sekretorischen Proteinen muß jedoch noch gezeigt werden.

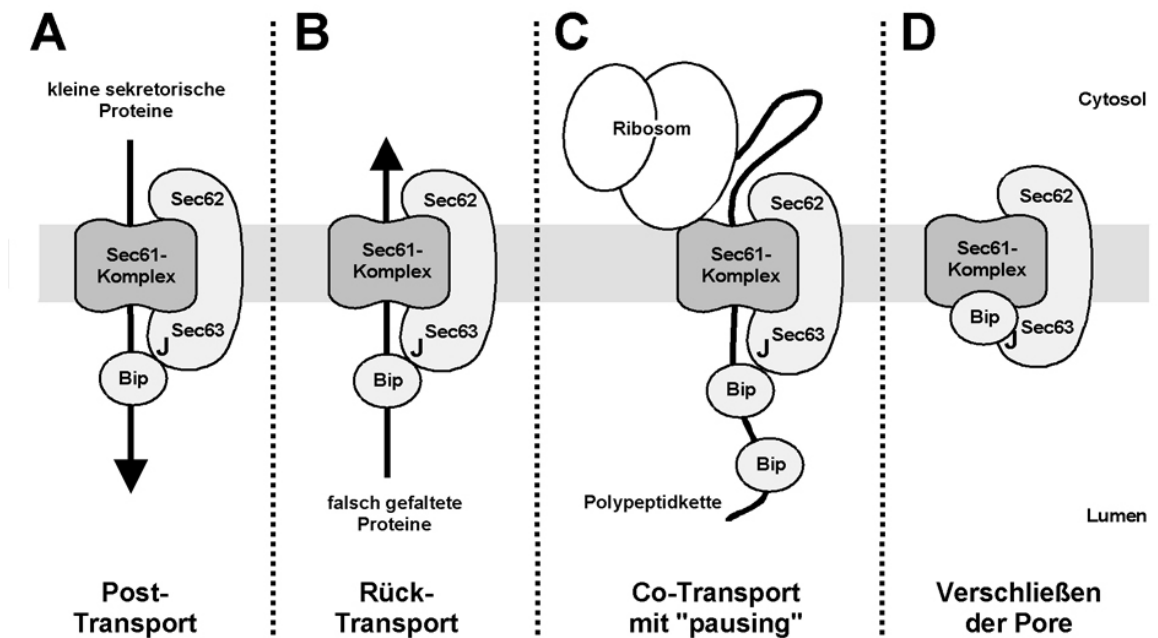


Abb. 33: Mögliche Funktion des pentameren Säuger- Sec61/62/63 Komplexes.

Eine weitere mögliche Funktion des Komplexes könnte der sogenannte Rücktransport von Proteinen sein (Abb. 33 B). In eukaryontischen Zellen werden falsch gefaltete Proteine aus dem Lumen des ER über den Sec61-Komplex zurück ins Cytoplasma transportiert, wo sie dann in einem Ubiquitin- und Proteasom-abhängigen Prozeß abgebaut werden (Wiertz *et al.*, 1996; Pilon *et al.*, 1997; Schmitz *et al.*, 2000). In der Hefe wurde gezeigt, daß neben dem Sec61-Komplex auch Sec63p sowie Kar2p am Rücktransport beteiligt sind (Plempner *et al.*, 1997; Gillece *et al.*, 2000). Da im Säuger fast alle Proteine cotranslational ins ER transportiert werden, könnte der Sec61/62/63 Komplex hauptsächlich den Rücktransport übernehmen. Das könnte erklären, warum die vorwiegend luminalen Bereiche von Sec62 und Sec63 zu den Hefeproteinen konserviert sind, und warum Sec71p und Sec72p im Säuger fehlen.

Die in der Arbeit durchgeführten Experimente zeigten, daß Sec62 und Sec63 jeweils nur mit Sec61-Komplexen assoziiert waren, die keine Ribosomen gebunden hatten. Jedoch kann mit diesem Befund nicht ausgeschlossen werden, daß die beiden Proteine nicht eine unterstützende Rolle beim cotranslationalen Transport spielen. Ihre Anwesenheit würde vor allem bei den cotranslationalen Transportvorgängen Sinn machen, bei denen die Ribosomen nicht fest an die Translokationspore gebunden sind (Abb. 33 C). Beim sogenannten „pausing“-Prozeß pausieren die Polypeptidketten bestimmter sekretorischer Proteine zeitweise im Translokationskomplex, ohne daß die Synthese der Proteine am Ribosom angehalten wird (Hedge *et al.*, 1998). Die nachfolgenden Bereiche der naszierenden Kette akkumulieren im Cytoplasma, wobei die feste Bindung zwischen Ribosom und Sec61-Komplex gelockert werden muß. Nach Wiederaufnahme der Translokation müssen diese Bereiche de facto posttranslational ins Lumen des ER transportiert werden, was mittels Sec63, Sec62 und BiP bewerkstelligt werden könnte. Dieses Modell könnte auch erklären, weshalb der Großteil von Sec62 und Sec63 nicht permanent in Komplex mit dem Sec61-Komplex gebunden ist. Beide Proteine interagieren jeweils nur temporär mit den cotranslationalen Translokationsporen um bestimmte zusätzliche Funktionen bereitzustellen. Neben dem „pausing“-Prozeß wäre in diesem Zusammenhang auch denkbar, daß Sec62 und Sec63 eine Rolle beim Verschließen von freien, nicht ribosomenassoziierten Sec61-Komplexen spielen (Abb. 33 D). Hamman *et al.* (1998) konnten zeigen, daß freie Sec61-Poren auf der luminalen Seite durch BiP verschlossen werden. Die Übertragung von BiP auf den Sec61-Komplex könnte dabei durch die DnaJ Domäne von Sec63 initiiert werden.

Weiterführende Studien müssen zeigen, ob und welche der aufgezählten Funktionsvarianten der neu Komplex im Säuger einnimmt.

5.3 Evolutionär konservierte Komponenten des ER-Translokationsapparates

Die in der Arbeit vorgestellten Ergebnisse unterstreichen, daß die eukaryontische ER-Translokationsmaschinerie hochgradig konserviert ist. Zum einen konnte gezeigt werden, daß die Signalpeptidase aus der Hefe *S. cerevisiae* in ihrer Untereinheitenkomposition der Signalpeptidase aus Säugerzellen entspricht. Beide SP-Komplexe unterscheiden sich nur insofern, daß im Säuger zwei homologe Isoformen zum Sec11p der Hefe existieren.

Desweiteren war es möglich, eine zum Sec-Komplex der Hefe ähnliche Struktur im Säuger zu identifizieren. Der Komplex besteht aus dem trimeren Sec61-Komplex, sowie zwei weiteren Proteinen, die Homologien zu Sec62p und Sec63p der Hefe aufzeigen. Die Funktion des Sec61/62/63 Komplexes im Säuger ist bisher noch unklar. Weiterführende Studien müssen zeigen, ob der neu gefundene Komplex funktionshomolog zum Sec-Komplex der Hefe ist.

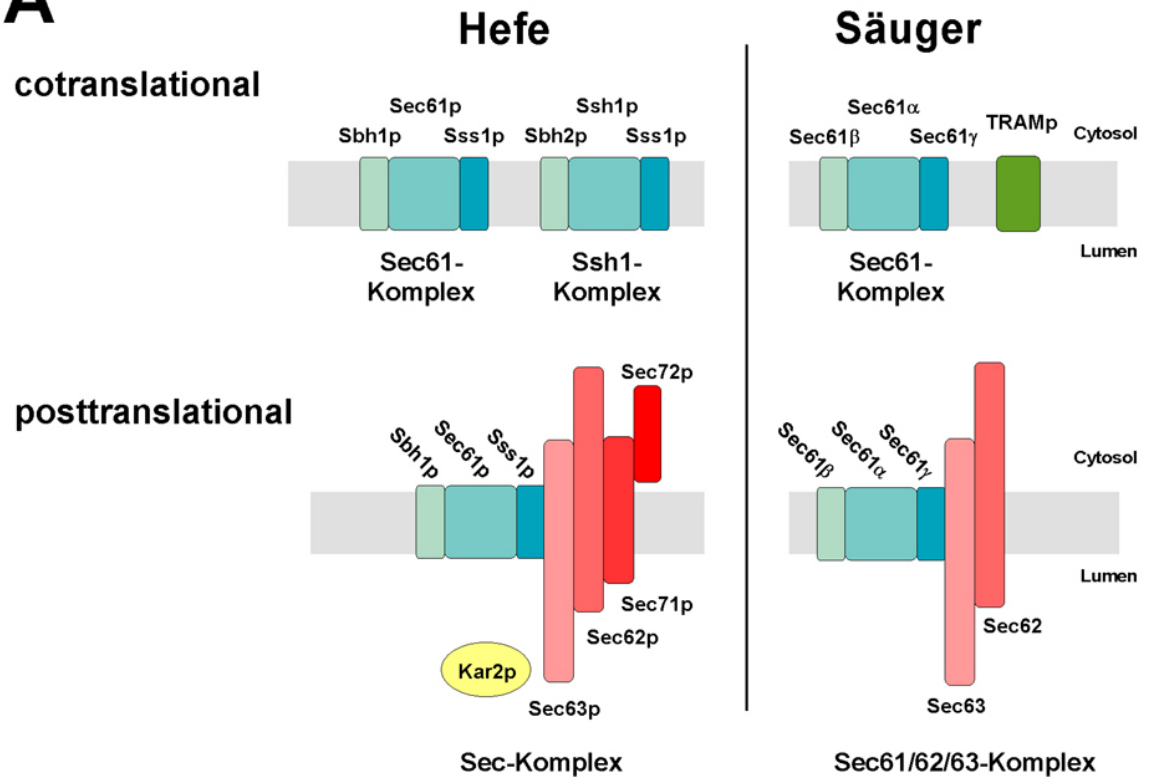
Abschließend sind in Abb. 34 die wichtigsten Komponenten für den Proteintransport durch die eukaryontische ER-Membran (bei Säugern und der Hefe *S. cerevisiae*) sowie durch die prokaryontische Plasmamembran (bei *E. coli*) vergleichend zusammengefaßt. Die in dieser Arbeit neu gefundenen Untereinheiten sind rot hervorgehoben.

Funktion	Komponente	Säuger	<i>S. cerevisiae</i>	<i>E. coli</i>
„Targeting“	SRP	7S-RNA SRP9 SRP14 SRP19 SRP54 SRP68 SRP72	scR1 Srp14p Sec65p Srp21p Srp54p Srp68p Srp72p	4,5 S-RNA P48
	SecB			SecB
	SRP-Rezeptor	SRPR α SRPR β	SR α (SR101) SR β	FtsY
Translokation	Sec61-Komplex	Sec61 α Sec61 β Sec61 γ	Sec61p Ssh1p Sbh1p Sbh2p Sss1p Sss1p	SecY SecE SecG
	Sec62/Sec63-Komplex	Sec62 *) Sec63 *)	Sec62p Sec63p Sec71p Sec72p	
	SecA			SecA
	TRAM	TRAMP		
	TRAP	TRAP α TRAP β TRAP γ TRAP δ		
	RAMP4	RAMP4	Ysy6p	
	BiP	BiP	Kar2p	
Modifikation	Signalpeptidase-Komplex	SPC25 SPC22/23 SPC21 SPC18 SPC12	Spc2p Spc3p Sec11p Spc1p	LepB
	Oligosaccharyl-transferase-Komplex	Ribophorin I Ribophorin II Ost5 DDOST DAD1 ITM1 N33	Ost1p Swp1p Ost5p Wbp1p Ost2p Stt3p Ost3p Ost4p	

*) Funktionshomologie bislang nicht nachgewiesen

Abb. 34: Vergleich der wichtigsten Komponenten für den Proteintransport durch die eukaryontische ER-Membran bei Säugerzellen und Hefe (*S. cerevisiae*) bzw. der prokaryontischen Plasmamembran der Eubakterien (*E. coli*). Die in der Arbeit neu gefundenen Untereinheiten sind rot hervorgehoben.

A



B

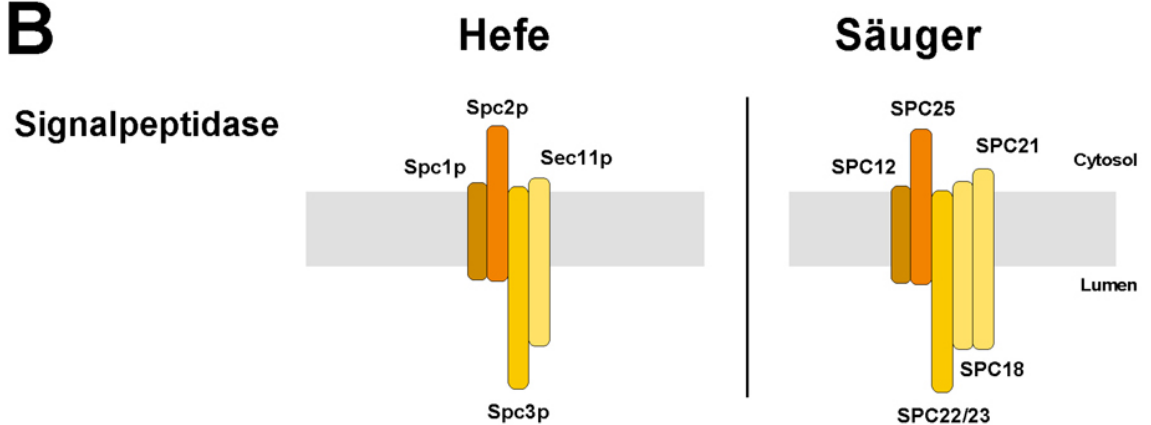


Abb. 35: **Ausgewählte Subkomplexe des ER-Translokons aus Hefe und Säuger**

A) In der Hefe *S. cerevisiae* sowie im Säuger bildet der trimere Sec61-Komplex (bläulich eingefärbt) die Zentrale Pore für den cotranslationalen Transport von Proteinen durch die ER-Membran. Die Hefe *S. cerevisiae* besitzt darüber hinaus noch den Ssh1-Komplex dessen Untereinheiten Homologe zu den Untereinheiten des Sec61-Komplexes darstellen. Der posttranslationale Transport von Proteinen durch die ER-Membran erfolgt in der Hefe mittels des Sec-Komplex. Der Sec-Komplex setzt sich aus dem trimeren Sec61-Komplex und dem tetrameren Sec62/63-Subkomplex (rötlich eingefärbt) zusammen. Das luminal Hsp70-Homologe Kar2p (gelb) wird für den effizienten Transport der Proteine benötigt. In Säugermembranen wurde ein Komplex identifiziert, der strukturelle Ähnlichkeiten zum Sec-Komplex der Hefe aufweist, es konnte jedoch noch nicht gezeigt werden, dass der Sec61/62/63-Komplex Funktionshomolog zum Sec-Komplex ist.

B) In der Hefe so wie im Säuger besteht die Signalpeptidase aus einem heteromeren Membranprotein-Komplex (gelb-bräunlich eingefärbt).

6 Anhang

Literatur

- Andersson, H. and von Heijne, G. 1994 Membrane protein topology: effects of $\Delta\mu H^+$ on the translocation of charged residues explain the 'positive inside' rule. *EMBO J.* 13, S.2267-2272
- Baker, R. K. and Lively, M. O. 1987 Purification and characterization of hen oviduct microsomal signal peptidase. *Biochemistry* 26, S.8561-8567
- Beckmann, R. et al. 1997 Alignment of conduits for the nascent polypeptide chain in the ribosome-Sec61 complex. *Science* 278, S.2123-2126
- Behrens, M. et al. 1991 Mitochondrial inner membrane protease 1 of *Saccharomyces cerevisiae* shows sequence similarity to the *Escherichia coli* leader peptidase. *Mol. Gen. Genet.* 228, S.167-176
- Birnboim, H. C. and Doly, J. 1979 A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 24, S.1513-1523
- Black, M. T. 1993 Evidence that the catalytic activity of prokaryote leader peptidase depends upon the operation of a serine-lysine catalytic dyad. *J. Bacteriol.* 175, S.4957-4961
- Blobel, G. and Dobberstein, B. 1975 Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane bound ribosomes of murine myeloms. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. *J. Cell Biol.* 67, S.835-862
- Boeke, J. D. et al. 1987 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods Enzymol.* 154, S.164-175
- Böhni, P. C. et al. 1988 SEC11 is required for signal peptide processing and yeast cell growth. *J. Cell Biol.* 106, S.1035-1042
- Bullock, W. O. et al. 1987 XL1-blue: a high efficiency plasmid transforming rec A *Escherichia coli* strain with betagalactosidase selection. *Biotechniques* 5, S.376-378
- Chirico, W. J. 1992 Dissociation of complexes between 70 kDa stress proteins and presecretory proteins is facilitated by a cytosolic factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189, S.1150-1156
- Chirico, W. J. et al. 1988 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature* 332, S.805-810
- Connolly, T. and Gilmore, R. 1989 The signal recognition particle receptor mediates the GTP-dependent displacement of SRP from the signal sequence of the nascent polypeptide. *Cell* 57, S.599-610
- Crowley, K. S. et al. 1994 Secretory proteins move through the endoplasmic reticulum membrane via an aqueous, gated pore. *Cell* 78, S.461-471
- Daimon, M. et al. 1997 Identification of a human cDNA homologue to the *Drosophila* translocation protein 1 (Dtrp1). *Biochem Biophys Res Commun.* 230, S.100-104
- Dalbey, R. E. and von Heijne, G. 1992 Signal peptidases in prokaryotes and eukaryotes--a new protease family. *Trends Biochem Sci.* 17, S.474-478
- Dalbey, R. E. et al. 1997 The chemistry and enzymology of the type I signal peptidases. *Protein Sci.* 6, S.1129-1138

- Deshaies, R. J. and Schekman, R. 1987 A yeast mutant defective at an early stage in import of secretory protein precursors into the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 105, S.633-645
- Deshaies, R. J. and Schekman, R. 1989 SEC62 encodes a putative membrane protein required for protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 109, S.2653-2664
- Deshaies, R. J. and Schekman, R. 1990 Structural and functional dissection of Sec62p, a membrane-bound component of the yeast endoplasmic reticulum protein import machinery. *Mol Cell Biol.* 10, S.6024-6035
- Deshaies, R. J. et al. 1988 A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature* 332, S.800-805
- Deshaies, R. J. et al. 1991 Assembly of yeast Sec proteins involved in translocation into the endoplasmic reticulum into a membrane-bound multisubunit complex. *Nature* 349, S.806-808
- Do, H. et al. 1996 The cotranslational integration of membrane proteins into the phospholipid bilayer is a multistep process. *Cell* 85, S.369-378
- Dower, W. J. et al. 1988 High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic. Acids Res.* 16, S.6127-6145
- Dünnwald, M. et al. 1999 Detection of transient in vivo interactions between substrate and transporter during protein translocation into the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* 10, S.329-344
- Economou, A. and Wickner, W. 1994 SecA promotes preprotein translocation by undergoing ATP-driven cycles of membrane insertion and deinsertion. *Cell* 78, S.835-843
- Economou, A. et al. 1995 SecA membrane cycling at SecYEG is driven by distinct ATP binding and hydrolysis events and is regulated by SecD and SecF. *Cell* 83, S.1171-1181
- Esnault, Y. et al. 1993 The yeast SSS1 gene is essential for secretory protein translocation and encodes a conserved protein of the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 12, S.4083-4093
- Evans, E. A. et al. 1986 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, S.581-585
- Fang, H. and Green, N. 1994 Nonlethal sec7 *Mol. Biol. Cell* 5, S.1-1
- Fang, H. et al. 1996 The homologue of mammalian SPC12 is important for efficient signal peptidase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 271, S.16460-16465
- Fang, H. et al. 1997 In addition to SEC11, a newly identified gene, SPC3, is essential for signal peptidase activity in the yeast endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 272, S.13152-13158
- Feldheim, D. and Schekman, R. 1994 Sec72p contributes to the selective recognition of signal peptides by the secretory polypeptide translocation complex. *J. Cell Biol.* 126, S.935-943
- Feldheim, D. et al. (1992) Topology and functional domains of Sec63p, an endoplasmic reticulum membrane protein required for secretory protein translocation. *Mol. Cell Biol.* 12, S.3288-3296
- Feldheim, D. et al. 1993 Structural and functional characterization of Sec66p, a new subunit of the polypeptide translocation apparatus in the yeast endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* 4, S.931-939
- Finke, K. et al. 1996 A second trimeric complex containing homologs of the Sec61p complex functions in protein transport across the ER membrane of *S. cerevisiae*. *EMBO J.* 15, S.1482-1494

- Gietz, R. D. and Schiestl, R., H. 1991 Applications of high efficiency lithium acetate transformation of intact yeast cells using single-stranded nucleic acids as carrier. *Yeast* 7, S.253-263
- Gillece, P. et al. 2000 The protein translocation channel mediates glycopeptide export across the endoplasmic reticulum membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97, S.4609-4614
- Gilmore, R. et al. 1982 Protein translocation across the endoplasmic reticulum. II. Isolation and characterization of the signal recognition particle receptor. *J. Cell Biol.* 95, S.470-477
- Goffeau, A. et al. 1996 Life with 6000 genes. *Science* 546, S.563-567
- Görllich, D. and Rapoport, T. A. 1993 Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* 75, S.615-630
- Görllich, D. et al. 1992a A mammalian homolog of SEC61p and SECYp is associated with ribosomes and nascent polypeptides during translocation. *Cell* 71, S.489-503
- Görllich, D. et al. 1992b *Nature* 357, S.47-52
- Green, N. et al. 1992 Mutants in three novel complementation groups inhibit membrane protein insertion into and soluble protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 116, S.597-604
- Guthrie, C. Fink, G. R. 1991 *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology. Methods in Enzymology.*
- Haeuptle, M. T. et al. 1989 A tripartite structure of the signals that determine protein insertion into the endoplasmic reticulum membrane. *J. Cell Biol.* 108, S.1227-1236
- Hamman, B. D. et al. 1998 BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the luminal end of the translocon pore before and early in translocation. *Cell* 92, S.747-758
- Hanein, D. et al. 1996 Oligomeric rings of the Sec61p complex induced by ligands required for protein translocation. *Cell* 87, S.721-732
- Hartmann, E. et al. 1994 Evolutionary conservation of components of the protein translocation complex. 367, S.654-657
- Hegde, R. S. et al. 1998 TRAM regulates the exposure of nascent secretory proteins to the cytosol during translocation into the endoplasmic reticulum. *Cell* 92, S.621-631
- Heinrich, S.U. et al. 2000 The Sec61p complex mediates the integration of a membrane protein by allowing lipid partitioning of the transmembrane domain. *Cell* 102, S.233-244
- High, S. et al. 1991 The identification of proteins in the proximity of signal-anchor sequences during their targeting to and insertion into the membrane of the ER. *J. Cell Biol.* 113, S.35-44
- High, S. et al. 1993 Site-specific photocross-linking reveals that Sec61p and TRAM contact different regions of a membrane-inserted signal sequence. *J. Biol. Chem.* 268, S.26745-26751
- Jackson, R. C. and Blobel G. 1980 Post-translational processing of full-length presecretory proteins with canine pancreatic signal peptidase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 343, S.391-404
- Janknecht, R. et al. 1991 Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, S.8972-8976
- Johnston, M. and Davis, R. W. 1984 Sequences that regulate the divergent GAL1-GAL10 promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 4, S.1440-1448

- Joly, J. C. and Wickner, W. 1993 The SecA and SecY subunits of translocase are the nearest neighbors of a translocating preprotein, shielding it from phospholipids. *EMBO J.* 12, S.255-263
- Jungnickel, B. and Rapoport, T. A. 1995 A posttargeting signal sequence recognition event in the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* 82, S.261-270
- Kalies, K. U. and Hartmann, E. 1996 Membrane topology of the 12- and the 25-kDa subunits of the mammalian signal peptidase complex. *J. Biol. Chem.* 271, S.3925-3929
- Kalies, K. U. and Hartmann, E. 1998 Protein translocation into the endoplasmic reticulum (ER)--two similar routes with different modes. *Eur. J. Biochem.* 254, S.1-5
- Kalies, K. U. et al. 1994 Binding of ribosomes to the rough endoplasmic reticulum mediated by the Sec61p-complex. *J. Cell Biol.* 126, S.925-934
- Kalies, K. U. et al. 1998 The beta subunit of the Sec61 complex facilitates cotranslational protein transport and interacts with the signal peptidase during translocation. *J. Cell Biol.* 141, S.887-894
- Kellaris, K. V. et al. 1991 ER translocation intermediates are adjacent to a nonglycosylated 34-kD integral membrane protein. *J. Cell Biol.* 114, S.21-33
- Klappa, P. et al. 1991 A microsomal protein is involved in ATP-dependent transport of presecretory proteins into mammalian microsomes. *EMBO J.* 10, S.2795-2803
- Klappa, P. et al. (1994). The membrane proteins TRAMP and sec61 alpha p may be involved in post-translational transport of presecretory proteins into mammalian microsomes. *FEBS Lett.* 341, S.281-287
- Knauer, R. and Lehle, L. (1999) The oligosaccharyltransferase complex from *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation of the OST6 gene, its synthetic interaction with OST3, and analysis of the native complex. *J. Biol. Chem.* 274, S.17249-17256
- Knight, B. C. and High, S. 1998 Membrane integration of Sec61alpha: a core component of the endoplasmic reticulum translocation complex. *Biochem J.* 331, S.161-167
- Kornfeld, R. and Kornfeld, S. 1985 Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* 54, S.631-664
- Kurihara, T. and Silver, P. 1993 Suppression of a sec63 mutation identifies a novel component of the yeast endoplasmic reticulum translocation apparatus. *Mol. Biol. Cell* 4, S.919-930
- Kurjan, J. and Herskowitz, I. 1982 Structure of a yeast pheromone gene (MF alpha): a putative alpha-factor precursor contains four tandem copies of mature alpha-factor. *Cell* 30, S.933-943
- Kutay, U. et al. 1993 A class of membrane proteins with a C-terminal anchor. *Trends Cell Biol.* 3, S.72-75
- Kutay, U. et al. 1995 Transport route for synaptobrevin via a novel pathway of insertion into the endoplasmic reticulum membrane. *EMBO J.* 14, S.217-223
- Kyte, J. and Doolittle, R. F. 1982 A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157, S.105-132
- Laemmli, U. K. 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, S.680-685
- Lauber, J. et al. 1996 The HeLa 200 kDa U5 snRNP-specific protein and its homologue in *Saccharomyces cerevisiae* are members of the DEXH-box protein family of putative RNA helicases. *EMBO J.* 15, S.4001-4015

- Lingappa, V. R. et al. 1984 Determinants for protein localization: beta-lactamase signal sequence directs globin across microsomal membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, S.456-460
- Lipp, J. et al. 1989 Structural requirements for membrane assembly of proteins spanning the membrane several times. *J. Cell Biol.* 109, S.2013-2022
- Lively, M. O. et al. 1994 Eukaryote microsomal signal peptidases. *Methods Enzymol.* 244, S.301-314
- Lyko, F. et al. 1995 Signal sequence processing in rough microsomes., *J. Biol. Chem.* 270, S.19873-19878
- Lyman, S. K. and Schekman, R. 1997 Binding of secretory precursor polypeptides to a translocon subcomplex is regulated by BiP. *Cell* 88, S.85-96
- Matlack, K. E. et al. 1997 Protein transport by purified yeast Sec complex and Kar2p without membranes. *Science* 277, S.938-941
- Matlack, K. E. et al. 1999 BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-alpha factor across the ER membrane. *Cell* 97, S.553-564
- Mellquist, J. L. et al. 1998 The amino acid following an asn-X-Ser/Thr sequon is an important determinant of N-linked core glycosylation efficiency. *Biochemistry* 37, S.6833-6837
- Meyer, D. I. et al. 1982 Secretory protein translocation across membranes-the role of the "docking protein". *Nature* 297, S.647-650
- Meyer, H. A. and Hartmann, E. 1997 The yeast SPC22/23 homolog Spc3p is essential for signal peptidase activity. *J. Biol. Chem.* 272, S.13159-13164
- Misselwitz, B. et al. 1998 J proteins catalytically activate Hsp70 molecules to trap a wide range of peptide sequences. *Mol. Cell* 2, S.593-603
- Mothes, W. et al. 1994 Systematic probing of the environment of a translocating secretory protein during translocation through the ER membrane. *EMBO J.* 13, S.3973-3982
- Mothes, W. et al. 1997 Molecular mechanism of membrane protein integration into the endoplasmic reticulum. *Cell* 89, S.523-533
- Mothes, W. et al. 1998 Signal sequence recognition in cotranslational translocation by protein components of the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol* 142, S.355-364
- Müller, G. and Zimmermann, R. 1988 Import of honeybee prepromelittin into the endoplasmic reticulum: energy requirements for membrane insertion. *EMBO J.* 7, S.639-648
- Mullins, C. et al. 1995 A mutation affecting signal peptidase inhibits degradation of an abnormal membrane protein in *Saccharomyces cerevisiae*., *J. Biol. Chem.* 270, S.17139-17147
- Mullins, C. et al. 1996 Structurally related Spc1p and Spc2p of yeast signal peptidase complex are functionally distinct. *J. Biol. Chem.* 271, S.29094-29099
- Müsch, A. et al. 1992 Yeast Sec proteins interact with polypeptides traversing the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* 69, S.343-352
- Ng, D. T. and Walter, P. 1996 ER membrane protein complex required for nuclear fusion. *J. Cell Biol.* 132, S.499-509
- Ng, D. T. et al. 1996 Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol* 134, S.269-278
- Nicchitta, C. V. et al. 1995 Stage- and ribosome specific alterations in nascent chain-Sec61p interactions accompany translocation across the ER membrane. *J Cell Biol* 129, S.957-970

- Nilsson, I. and von Heijne, G. 1992 A signal peptide with a proline next to the cleavage site inhibits leader peptidase when present in a sec-independent protein. *FEBS Lett.* 299, S.243-246
- Noel, P. and Cartwright, I. L. 1994 A Sec62p-related component of the secretory protein translocon from *Drosophila* displays developmentally complex behavior. *EMBO J.* 13,
- Nunnari, J. et al. 1997 A mitochondrial protease with two catalytic subunits of nonoverlapping specificities. *Science* 262, S.1997-2004
- Paetzel, M. et al. 1997 Use of site-directed chemical modification to study an essential lysine in *Escherichia coli* leader peptidase. *J. Biol. Chem.* 272, S.9994-1000
- Paetzel, M. et al. 1998 Crystal structure of a bacterial signal peptidase in complex with a beta-lactam inhibitor. *Nature* 396, S.186-190
- Palade, G. 1975 Intracellular aspects of the process of protein secretion. *Science* 189, S.347-358
- Panzner, S. et al. 1995 Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p. *Cell* 81, S.561-570
- Pilon, M. et al. 1997 Sec61p mediates export of a misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum to the cytosol for degradation. *EMBO, J.* 16, S.4540-4548
- Plath, K. et al. 1998 Signal sequence recognition in posttranslational protein transport across the yeast ER membrane. *Cell* 94, S.795-807
- Plempner, R. K. et al. 1997 Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. *Nature* 388, S.891-895
- Pohlschröder, M. et al. 1997 Protein translocation in the three domains of life: variations on a theme. *Cell* 91, S.563-566
- Prehn, S. et al. 1989 Structure and biosynthesis of the signal-sequence receptor. *Eur. J. Biochem.* 188, S.439-445
- Prinz, A. et al. 2000 Evolutionarily conserved binding of ribosomes to the translocation channel via the large ribosomal RNA. *EMBO J.* 19, S.1900-1906
- Rapiejko, P. J. and Gilmore, R. 1997 Empty site forms of the SRP54 and SR alpha GTPases mediate targeting of ribosome-nascent chain complexes to the endoplasmic reticulum. *Cell* 89, S.703-713
- Robinson, J. S. et al. 1988 Protein sorting in *Saccharomyces cerevisiae*: isolation of mutants defective in the delivery and processing of multiple vacuolar hydrolases. *Mol. Cell. Biol.* 11, S.4936-4948
- Rothblatt, J. A. et al. 1987 Secretion in yeast: structural features influencing the post-translational translocation of prepro-alpha-factor in vitro. *EMBO J.* 6, S.3455-3463
- Rothblatt, J. A. et al. 1989 Multiple genes are required for proper insertion of secretory proteins into the endoplasmic reticulum in yeast. *J. Cell Biol.* 109, S.2641-2652
- Sadler, I. et al. 1989 A yeast gene important for protein assembly into the endoplasmic reticulum and the nucleus has homology to DnaJ, an *Escherichia coli* heat shock protein. *J. Cell Biol.* 109, S.2665-2675
- Sambrook, E. et al. 1989 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanders, S. L. et al. 1992 Sec61p and BiP directly facilitate polypeptide translocation into the ER. *Cell* 69, S.353-365

- Schlenstedt, G. and Zimmermann, R. 1987 Import of frog prepropeptide GLa into microsomes requires ATP but does not involve docking protein or ribosomes. *EMBO J.* 6, S.699-703
- Schlenstedt, G. et al. 1995 A yeast DnaJ homologue, Scj1p, can function in the endoplasmic reticulum with BiP/Kar2p via a conserved domain that specifies interactions with Hsp70s. *J.* 129, S.979-988
- Schmitz, A. et al. 2000 Cholera toxin is exported from microsomes by the Sec61p complex. *J. Cell Biol.* 148, S.1203-1212
- Schneider, B. L. et al. 1995 Use of polymerase chain reaction epitope tagging for protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 11, S.65-74
- Scidmore, M. A. et al. 1993 Genetic interactions between KAR2 and SEC63, encoding eukaryotic homologues of DnaK and DnaJ. *Mol. Biol. Cell* 4, S.1145-1159
- Shelness, G. S. and Blobel G. 1990 Two subunits of the canine signal peptidase complex are homologous to yeast SEC11 protein. *J. Biol. Chem.* 265, S.9512-9519
- Sikorski, R. S. and Hieter, P. 1989 A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, S.19-27
- Skowronek, M. H. et al. 1999 Molecular characterization of a novel mammalian DnaJ-like Sec63p homolog. *Biol. Chem.* 380, S.1133-1138
- Spiess, M. 1995 Heads or tails - what determines the orientation of proteins in the membrane. *FEBS Lett.* 369, S.76-79
- Stirling, C. J. et al. 1992 Protein translocation mutants defective in the insertion of integral membrane proteins into the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* 3, S.129-142
- Sung, M. and Dalbey, R. E 1992 Protein identification of potential active-site residues in the *Escherichia coli* leader peptidase. *J. Biol. Chem.* 267, S.13154-13159
- Tschantz, W. R. et al. 1993 A serine and a lysine residue implicated in the catalytic mechanism of the *Escherichia coli* leader peptidase. *J. Biol. Chem.* 268, S.27349-27354
- Van Dijk, J. M. et al. 1992). Signal peptidase I of *Bacillus subtilis*: patterns of conserved amino acids in prokaryotic and eukaryotic type I signal peptidases. *EMBO J.* 11, S.2819-2828
- van Valkenburgh, C. et al. 1999 The catalytic mechanism of endoplasmic reticulum signal peptidase appears to be distinct from most eubacterial signal peptidases., *J. Biol. Chem.* 274, S.11519-11525
- Varki, A. 1993 Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* 3, S.97-13
- Vogel, J. P. et al. 1990 Loss of BiP/GRP78 function blocks translocation of secretory proteins in yeast. *J. Cell Biol.* 110, S.1885-1895
- Voigt, S. et al. 1996 Signal sequence-dependent function of the TRAM protein during early phases of protein transport across the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol* 134, S.25-35
- von Heijne, G. 1985 Signal sequences. The limits of variation. *J. Mol. Biol.* 184, S.99-10
- von Heijne, G. 1990 Protein targeting signals. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2, S.604-608
- von Heijne, G. 1995 Protein sorting signals: simple peptides with complex functions. *EXS* 73, S.67-76

- Walter, P. and Blobel, G. 1980 Purification of a membrane-associated protein complex required for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, S.7112-7116
- Walter, P. and Blobel, G. 1981 Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes. *J. Cell Biol.* 91, S.545-561
- Walter, P. and Blobel, G. 1982 Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Nature* 299, S.691-698
- Walter, P. et al. 1981 Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal recognition protein (SRP) binds to in vitro assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J. Cell Biol.* 91, S.545-550
- Wickner, W. T. and Lodish, H. F. 1985 Multiple mechanisms of protein insertion into and across membranes. *Science* 230, S.400-407
- Wiedmann, M. et al. 1988 Post-translational transport of proteins into microsomal membranes of *Candida maltosa*. *EMBO, J.* 7, S.1763-1768
- Wiertz, E. J. et al. 1996 Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature* 384, S.432-438
- Wilkinson, B. M. et al. 1996 Determination of the transmembrane topology of yeast Sec61p, an essential component of the endoplasmic reticulum translocation complex. *J. Biol. Chem* 271, S.25590-25597
- Wittke, S. et al. 1999 Probing the molecular environment of membrane proteins in vivo. *Mol. Biol. Cell.* 10, S.2519-2530
- Wolfe, P. B. et al. 1985 Effects of two sec genes on protein assembly into the plasma membrane of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 260, S.1836-1841
- YaDeau, J. T. and Blobel, G. 1989 Solubilization and characterization of yeast signal peptidase. *J. Biol. Chem.* 264, S.2928-2934
- YaDeau, J. T. et al. 1991 Yeast signal peptidase contains a glycoprotein and the Sec11 gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, S.517-521
- Zimmermann, R. and Mollay, C. 1986 Import of honeybee preproinsulin into the endoplasmic reticulum. Requirements for membrane insertion, processing, and sequestration., *J. Biol.* 261, S.12889-12895
- Zimmermann, R. et al. 1990 Ribonucleoparticle-independent import of proteins into mammalian microsomes involves a membrane protein which is sensitive to chemical alkylation. *Biochimie* 72, S.95-10
- Zwizinski, C. and Wickner, W. 1980 Purification and characterization of leader (signal) peptidase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 255, S.7973-7977

Abkürzungsverzeichnis

As	Aminosäuren
Con A	Concanavalin A
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eq	Äquivalent (engl. equivalent), Konzentrationsangabe bei Membranen. 0,05 OD ₂₈₀ = 1 eq.
ER	Endoplasmatisches Retikulum
H	Stunde
HEPES	N-[2- Hydroxyethyl]piperazin-N'-2- ethansulfonsäure
Kac	Kaliumacetat
Min	Minute
nm	Nanometer (10 ⁻⁹ m)
OD₆₀₀	Optische Dichte bei der Wellenlänge λ = 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
Pi	Protease-Inhibitor Mix
PK-RM	Puromycin und Hochsalz behandelte rauhe Mikrosomen
RAMP	ribosomenassoziierte Membranproteine
RM	rauhe Mikrosomen
s	Sekunde
sek.	sekundär
SBH1	Sec sixty-one beta homolog 1
SBH2	Sec sixty-one beta homolog 2
SD	glucosehaltiges Minimalmedium für Hefen
SDS	Natriumdodecylsulfat
SGal	Galaktose -haltiges Minimalmedium für Hefen
SSGal	Galaktose- und Saccharose haltiges Minimalmedium für Hefen
SP-Komplex	Signalpeptidase-Komplex
SP-Sepharose	Kationenaustauscher mit einer Sulfopropylgruppe
SRP	Signalerkennungspartikel (engl.: Signal recognition particle)
SRP54	54 kD Untereinheit des Signalerkennungspartikels (SRP)
SRPR	Signalerkennungspartikelrezeptor
SSH1	Sec sixty-one homolog 1
SSS1	Sec sixty-one suppressor 1
TCA	Trichloressigsäure (engl. trichlor-acetic acid)

TRAM	T ranslocating chain a ssociated m embrane protein
TRAP	T ranslocon- a ssociated m embrane p rotein
Tris	Tris -(hydroxymethyl)-aminomethan
wt	W ildtyp
YPD	Glucose-haltiges Vollmedium für Hefen
YPGal	Galaktose-haltiges Vollmedium für Hefen

Lebenslauf

Hellmuth-Alexander Meyer

geboren am 2. März 1969 in Berlin/Spandau, verheiratet, ein Kind

deutsche Staatsangehörigkeit

Aug. 1988	Erwerb der allgemeinen Hochschulreife (Abitur) in Berlin
Sept. 1988 - Dez. 1994	Studium der Biologie an der Freien Universität Berlin
Dez. 1994	Hochschulabschluß als Diplom-Biologe
	Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Knud Nierhaus am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin mit dem Thema: "Antisense DNA Analyse einer Stamm-Schleifen-Struktur, welche die längste universell konservierte Sequenz ribosomaler RNA enthält".
Jan. 1995 - Juli 1995	Fortsetzung der im Diplom begonnenen wissenschaftlichen Arbeiten in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K. Nierhaus.
Aug. 1995 - Mai 1998	Beginn der vorliegenden Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Enno Hartmann am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin.
Juni 1998 - April 2000	Fortführung der Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Enno Hartmann am Zentrum Biochemie und Molekulare Zellbiologie der Universität Göttingen.
Seit Aug. 2000	Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Siegfried Prehn am Institut für Biochemie der Charité-Berlin. Thematischer Arbeitsschwerpunkt: "Überexpression und Reinigung eines Minimal-Signalpeptidase-Komplexes aus der Hefe <i>S. cerevisiae</i> zum Zweck der Kristallisation".

Publikationsliste

Meyer, H. A., Triana-Alonso, F., Spahn, C. M., Twardowski, T., Sobkiewicz, A. and Nierhaus, K. H. (1996). Effects of antisense DNA against the alpha-sarcin stem-loop structure of the ribosomal 23S rRNA. *Nucleic Acids Res.* 24, 3996-4002.

Mullins, C., **Meyer, H. A.**, Hartmann, E., Green, N. and Fang, H. (1996). Structurally related Spc1p and Spc2p of yeast signal peptidase complex are functionally distinct. *J. Biol. Chem.* 271, 29094-29099.

Meyer, H. A. and Hartmann, E. (1997). The yeast SPC22/23 homolog Spc3p is essential for signal peptidase activity. *J. Biol. Chem.* 272, 13159-13164.

Meyer, H. A., Grau, H., Kraft, R., Kostka, S., Prehn, S., Kalies, K. U. and Hartmann, E. (2000). Mammalian Sec61 is associated with Sec62 and Sec63. *J. Biol. Chem.* 275, 14550-14557.

Antonin, W.*, **Meyer, H. A.*** and Hartmann, E. (2000). Interactions between Spc2p and other components of the ER translocation sites of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 275, 34068-34072. * both authors contributed equally to the work

Erklärung

Hiermit versichere ich, Hellmuth-Alexander Meyer, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt habe. Darüber hinaus habe ich mich weder anderwärts um einen Doktorgrad beworben noch bin ich in Besitz eines entsprechenden Doktorgrades.

Berlin, den

Danksagung

Die von Prof. Enno Hartmann betreute Doktorarbeit wurde am Max Delbrück Centrum in Berlin begonnen und am Institut für Biochemie der Uni Göttingen fertiggestellt. All jenen, die mich in den letzten Jahren durch Diskussionsbereitschaft und tatkräftige Hilfe unterstützt haben, möchte ich an dieser Stelle Danke sagen.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Enno Hartmann für seine wissenschaftliche und menschliche Unterstützung, mit der er diese Arbeit stets begleitet hat. Bei Wolfram Antonin bedanke ich mich herzlich für die gute Zusammenarbeit beim Signalpeptidase-Projekt sowie für die gemeinsam verbrachte Zeit in Berlin und Göttingen. Harald Grau half mir bei den mühsamen Präparationen von Mikrosomen aus Rinderpankreas, wofür ich ihm sehr dankbar bin. Zu Dank verpflichtet bin ich auch Marylena Dabrowsky, Steffen Panzner und Thomas Sommer, die mich zu Beginn meiner Doktorandenzeit mit Hilfestellungen und zahlreichen Ratschlägen unterstützt haben. Ein herzliches Dankeschön geht auch an Brigitte Nentwig, Petra Schlotterhose und Angelika Wittstruck für die hervorragende technische Assistenz im täglichen Laboralltag. Bei Elke Bürger und Sigfried Prehn bedanke ich mich für die Clonierung und Sequenzierung der humanen Sec62 und Sec63. Die Aminosäuresequenzierungen der vorliegenden Arbeit wurden von Regine Kraft und Susanne Kostka durchgeführt. Auch ihnen sei an dieser Stelle sehr gedankt. Bei Ute Platzer bedanke ich mich herzlich für die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Ich hoffe, Kerstin weiß wieviel ich Ihr verdanke.